

**(12) INTERNATIONAL REGISTRATION PUBLISHED PURSUANT TO THE TREATY ON  
INTERNATIONAL COOPERATION IN THE PATENT AREA (PCT)**

(19) **World Intellectual Property Organisation** **PCT**  
- International office

(43) **International publication date**  
**January 3, 2002 (01/03/2002)**

(10) **International publication number**  
**WO 02/00901 A1**

(51) **International patent classification<sup>7</sup>:** C12N 15/82  
15/62, 9/02, 9/90, A01H 5/00

(21) **International reference number:** PCT/EP01/07391

(22) **International application date:**  
June 28, 2001 (06/28/2001)

(25) **Filing language:** German

(26) **Publication language:** German

(30) **Information regarding priority:**  
100 30 647.0 June 29, 2000 (06/29/2000) DE  
100 64 454.6 December 21, 2000 (12/21/2000) DE

(71) **Applicant (for all designated states except US):**  
**SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE];**  
Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

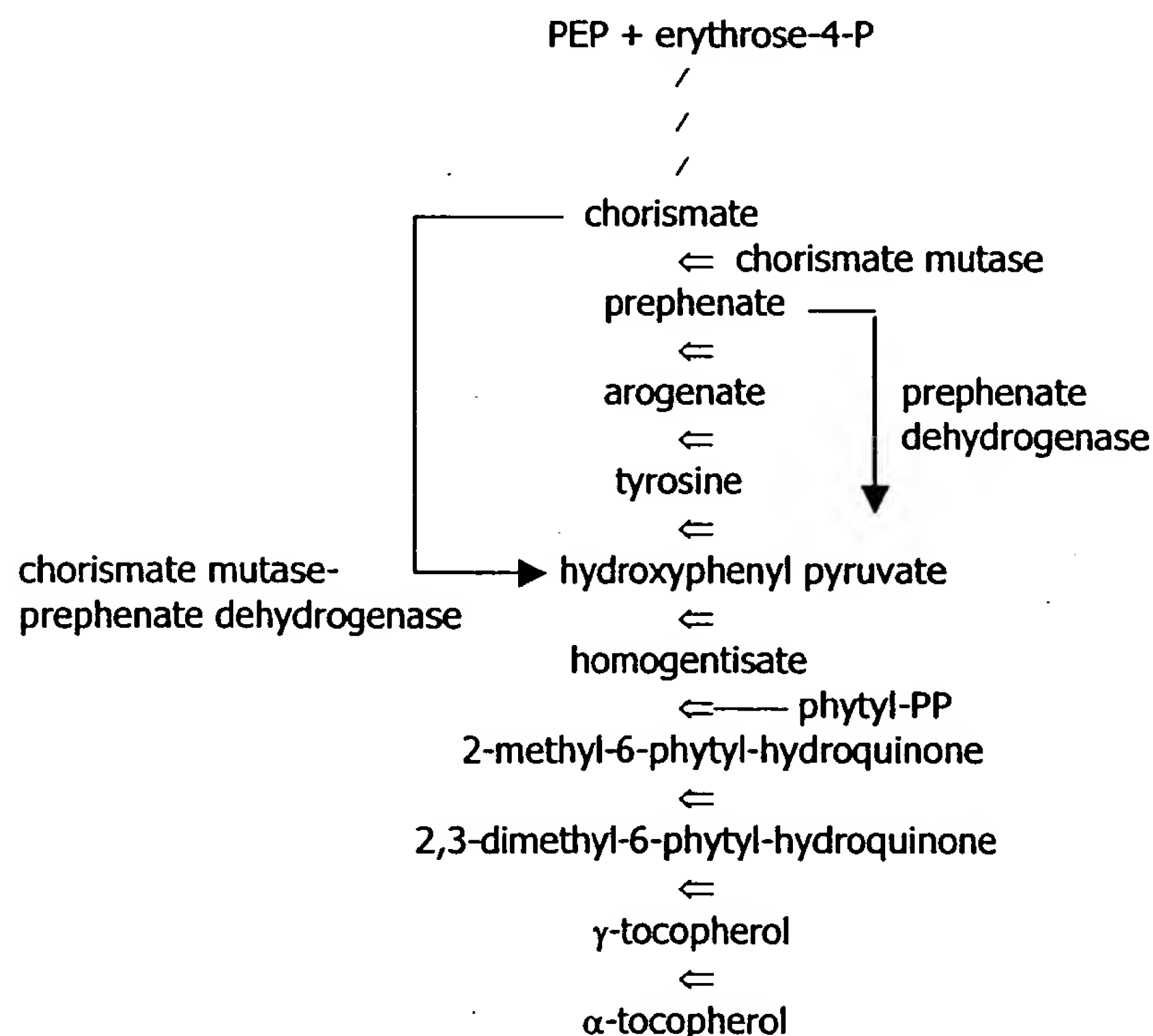
(72) **Inventor; and**  
(75) **Inventor/Applicant (only for US):** BADUR, Ralf  
[DE/DE]; Von Eckenbrecher Weg 2, 38642 Goslar (DE);  
GEIGER, Michael [DE/DE]; Neuer Weg 15, 06484  
Quedlinburg (DE); KUNZE, Irene [DE/DE]; Mühlenweg  
11, 06466 Gatersleben (DE); SOMMER, Susanne  
[DE/DE]; Am Kreishaus 12a, 65719 Hofheim (DE).

(74) **Attorney:** BIEBERACH, Andreas; c/o BASF  
Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) **Designated states (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[continued on the following page]

**(54) Title: CHANGING THE FINE CHEMICAL CONTENT IN ORGANISMS BY GENETICALLY  
MODIFYING THE SHIKIMATE PATHWAY**



**(57) Abstract:** The invention relates to a method for producing fine chemicals, especially vitamin E, vitamin K and/or ubiquinone, by cultivating organisms, especially plants, exhibiting a genetically modified shikimate pathway in relation to the wild type. The invention also relates to the transgenic organisms themselves.

*[continued on the following page]*

WO 02/00901 A1

---

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) Designated states (*regional*): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- with international search report
- prior to the deadline applying to modifications of the claims; publication will be repeated if modifications occur
- with the sequence protocol of the description in electronic form published separately; available upon request from the International Office

*For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, please refer to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

---

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for producing fine chemicals, especially vitamin E, vitamin K and/or ubiquinone, by cultivating organisms, especially plants, exhibiting a genetically modified shikimate pathway in relation to the wild type. The invention also relates to the transgenic organisms themselves.

Changing the fine chemicals content in organisms by genetically modifying the shikimate pathway.

#### Specification

The present invention relates to a method for producing fine chemicals, especially vitamin E, vitamin K and/or ubiquinone, by cultivating organisms, especially plants, exhibiting a genetically modified shikimate pathway in relation to the wild type. The invention also relates to the transgenic organisms themselves.

Organisms, in particular plants, exhibit a number of metabolites that have a significant economic value as fine chemicals. For example, these fine chemicals include aromatic amino acids, salicylic acid derivatives, phenyl-propanoids, flavonoids, stilbenes, xanthenes and quinones, in particular the mixed prenyl-lipid compounds with vitamin E or vitamin K activity.

Organisms that are capable of producing these fine chemicals are cultivated in biotechnical processes for the production of fine chemicals, and the desired fine chemicals are isolated from the organisms.

It is desirable, both with regard to economical methods for the biotechnical production of fine chemicals and with regard to the use of the organisms as processed or non-processed feed or foodstuffs, to specifically modify the fine chemicals content in the organisms, e.g. to increase the content of the desired fine chemical and/or to impede the metabolite flow to undesired fine chemicals.

Economically important fine chemicals include for instance plastoquinones, ubiquinones as well as compounds with vitamin E or vitamin K activity that exhibit an isoprenoid side chain connected with an aromatic nucleus.

The eight compounds with vitamin E activity that occur in nature are derivatives of the 6-chromanol (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). The group of tocopherols (1a-d) exhibits a saturated side chain, the group of tocotrienols (2a-d) an unsaturated side chain:



[Fig.]

(1)

[Fig.]

(2)

In the present invention, the term vitamin E refers to all tocopherols and tocotrienols with vitamin E activity mentioned above.

These compounds with vitamin E activity are important natural lipid-soluble antioxidants. A lack of vitamin E results in pathophysiological situations in human beings and animals. Vitamin E compounds therefore have great economic value as additives in the feed and foodstuffs sector, in pharmaceutical formulations and in cosmetic applications.

The compounds with vitamin K activity that occur in nature are derivatives of the 1,4-naphthoquinone (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 5., 488-506, Vitamin K). Phylloquinone (former name: vitamin K<sub>1</sub>) exhibits a mostly saturated side chain, whereas the group of menaquinones-n (former name: vitamin K<sub>2</sub>) exhibits an unsaturated side chain with 4 to 13 isoprenyl remnants.

In the present invention, the term vitamin K refers to all compounds with vitamin K activity, in particular the compounds mentioned above.

The starting point of the biosynthesis of the isoprenoid side chain is isopentenyl pyrophosphate (IPP). IPP is in balance with its isomer dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). A condensation of IPP with DMAPP in a head-tail attachment results in the monoterpene (C10) geranyl pyrophosphate (GPP). The addition of further IPP units leads to sesquiterpene (C15) farnesyl pyrophosphate (FPP) and to diterpene (C20) geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP).

Phylloquinone contains a C20 phytyl chain in which only the first isoprene unit has a double bond. GGPP is reshaped to phytyl pyrophosphate (PP), the starting substance for the creation of tocopherols, by the geranyl geranyl pyrophosphate oxidoreductase (GGPPOR).

The circular structures of the mixed prenyl-lipids, which lead to the formation of the vitamins E and K, are quinones whose starting metabolites come from the shikimate pathway.

Chorismate is formed starting from erythrose-4-phosphate and phosphoenolpyruvate (PEP) by their condensation to 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) via the intermediate steps 3-dehydroquinate, 3-dehydroshikimate, shikimate, shikimate-3-phosphate and 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate. Here, the erythrose-4-phosphate is formed by the Calvin cycle and the PEP is provided by the glycolysis.

In higher plants, tyrosine is formed starting from chorismate via prephenate and arogenate. The aromatic amino acid tyrosine is converted into hydroxyphenylpyruvate, which is transferred by dioxygenation into homogentisic acid.

The homogentisic acid is subsequently bonded to phytyl pyrophosphate (PPP) or geranyl geranyl pyrophosphate in order to form the precursors of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol, namely the 2-methyl-6-phytyl hydroquinone or the 2-methyl-6-geranyl geranyl hydroquinone. By means of methylation steps with S-adenosylmethionine as methyl group donor, 2,3-dimethyl-6-phytylquinol is formed first, followed by  $\gamma$ -tocopherol by means of cyclization and finally  $\alpha$ -tocopherol by means of further methylation.

It is known to modify the vitamin E content in plants by means of overexpression or downregulation of biosynthesis genes of the tocopherol biosynthesis pathway, by which the biosynthesis pathway from hydroxyphenylpyruvate to tocopherol is understood in the present invention.

WO 97/27285 describes a modification of the tocopherol content by means of overexpression or downregulation of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD).

WO 99/04622 and D. DellaPenna et al., Science 1998, 282, 2098-2100, respectively, describe gene sequences encoding for a  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase from *synechocystis* PCC6803 and *Arabidopsis thaliana* and their insertion in transgenic plants that exhibit a modified vitamin E content.

It is further known that to modify the vitamin E content in plants by means of overexpression or downregulation of biosynthesis genes of the biosynthesis pathway of the isoprenoid side chain.

WO 99/23231 shows that the expression of a geranyl geranyl reductase in transgenic plants results in an increased tocopherol biosynthesis.

WO 00/08169 describes gene sequences encoding a 1-deoxy-D-xylose-5-phosphate synthase and a geranyl geranyl pyrophosphate oxidoreductase and their insertion in transgenic plants that exhibit a modified vitamin E content.

While all these methods provide organisms, in particular plants, that exhibit a modified content of the fine chemical vitamin E, the level of the vitamin E content is nevertheless not yet satisfactory for methods to produce vitamin E by means of isolation from these transgenic organisms.

Thus, the invention was based on the object of providing an additional method for the production of fine chemicals by cultivating organisms or transgenic organisms capable of producing fine chemicals with optimized properties that do not exhibit the disadvantages of the prior art described above.

Accordingly, a method to produce fine chemicals was invented by cultivating organisms that exhibit a genetically modified shikimate pathway in relation to the wild type.

In the present invention, the term shikimate pathway refers to the previously described biosynthesis pathway, in particular for higher plants, starting from D-erythrose-4-phosphate through shikimate, chorismate, prephenate, arogenate, tyrosine up to and including 4-hydroxyphenylpyruvate (G. Michal, Biochemical Pathways, Biochemie-Atlas, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 1999, pp. 59 to 60, figs. 4.7-1 and chapter 4.7.1).

In the present invention, the term shikimate pathway refers preferably to the metabolic pathway from shikimate to 4-hydroxyphenylpyruvate, especially preferably to the metabolic pathway from chorimate to 4-hydroxyphenylpyruvate, with the metabolic pathway for plants running from chorismate via prephenate, arogenate and tyrosine.

The term fine chemicals refers to metabolites of the organism resulting from the shikimate pathway. Here, the shikimate pathway begins with D-erythrose-4-phosphate and ends with 4-hydroxyphenylpyruvate, as described above. For these metabolites, the starting compound D-erythrose-4-phosphate, the final compound 4-hydroxyphenylpyruvate and any intermediate steps of the shikimate pathway mentioned above represent the starting compounds, hereafter also called intermediate compounds, which are converted biosynthetically into the metabolites by the organism.

Preferred fine chemicals are the aromatic amino acids, such as phenylalanine, tyrosine and tryptophan, salicylic acid derivatives, folic acid derivatives, phenylpropanoids, such as lignin, lignans or coumarins, in particular scopoletin or scopolin, flavonoids, such as chalcones, flavanones, flavanols, anthocyanidins or isoflavonoids, stilbenes, xanthones or quinone derivatives, such as vitamin E, vitamin K, ubiquinones, plastoquinones or shikonin.

Especially preferred fine chemicals are vitamin E, vitamin K or ubiquinone, in particular vitamin E.

Depending on whether the genetic modification of the shikimate pathway results in an increase or decrease of the metabolite flow to a particular intermediate compound – which is part of the shikimate pathway –, the content of the fine chemical that is produced biosynthetically in the organism from this intermediate compound increases or decreases, respectively. Thus the term genetic modification of the shikimate pathway refers preferably to the increase or decrease of the metabolite flow to an intermediate compound of the shikimate pathway.

Genetic modification of the shikimate pathway that lead to an increase of the metabolite flow to the intermediate compound, and thus to the corresponding fine chemical, include the following measures A, B or C, for example:

A: Increasing the activity of at least one enzyme of the shikimate pathway of the wild type,

for example by overexpression of genes of the shikimate pathway that encode proteins with this enzymatic activity, by eliminating negative regulation mechanisms of metabolic pathways leading to the intermediate compound, e.g. eliminating the feedback inhibition or the insertion of orthologous genes that are not subject to any regulation in the desired organism.

B: Inserting at least one gene into the organism for which the wild type exhibits no orthologous gene and which bypasses the metabolic pathway of the shikimate pathway of the wild type. By means of the new gene function, this gene may be able to effect an increase of the metabolite flow to the intermediate compound where the bypass ends.

C: Inactivation of genes encoding enzymes competing with the enzymes of the metabolic pathway that leads to the desired product.

Genetic modifications of the shikimate pathway resulting in a decrease of the metabolite flow to an intermediate compound and thus to the corresponding fine chemical include the following measures D, E or F, for example:

D: Overexpression of a metabolite gene and thus the increase of the corresponding enzyme activity leading away from this intermediate compound;

E: Inactivation of genes encoding enzymes leading to this intermediate compound, for example by means of antisense technology or cosuppression;

F: Expression of a gene for which the wild type exhibits no orthologous gene. For example, this gene may be able to bypass the metabolic pathway of the shikimate pathway of the wild type and effect a decrease of the metabolite flow to the bypassed intermediate compounds by means of the new gene function.

In a preferred embodiment of the method according to the invention, the genetic modification of the shikimate pathway in the organism results in an increase of the metabolite flow to a desired intermediate compound and thus to the corresponding desired fine chemical.

The increase of the metabolite flow to a desired intermediate compound of the shikimate pathway and thus to the corresponding desired fine chemical occurs preferably by means of at least one measure selected from the group of measures A and B, i.e. by means of the measure A and/or B, with the measures A and B having the meaning described above.

A preferred embodiment of the method according to the invention is therefore characterized in that at least one measure is selected from the group of measures A and B for the genetic modification of the shikimate pathway, with A and B having the following meaning:

- A: Increasing the activity of at least one enzyme of the shikimate pathway of the wild type;
- B: Inserting at least one gene into the organism for which the wild type exhibits no orthologous gene and which bypasses the metabolic pathway of the shikimate pathway of the wild type.

Increasing the activity of at least one enzyme of the shikimate pathway of the wild type according to measure A may occur by overexpression of nucleic acids, that is, genes of the shikimate pathway, that encode proteins with this enzymatic activity, by eliminating negative regulation mechanisms of metabolic pathways leading to the intermediate compound, e.g. eliminating the feedback inhibition or the insertion of orthologous genes that are not subject to any regulation in the desired organism.

The increase of the activity of at least one enzyme of the shikimate pathway of the wild type according to measure A occurs preferably by overexpression of nucleic acids of the shikimate pathway that encode proteins with this enzymatic activity.

In a preferred embodiment of the method, measure A is carried out in such a way that a nucleic acid encoding a chorismate mutase is inserted into the organism.



The term chorismate mutase refers to a protein that exhibits the enzymatic activity of converting chorismate into prephenate.

In principle, any chorismate mutase can be used in the method according to the invention, for example the chorismate mutase from *Petroselinum Crispum* (Accession number: T14902, T14901), the chorismate mutase from *Streptomyces coelicor* (T36865), the chorismate mutase from *Bacillus subtilis* (A33894), the chorismate mutase from *Aspergillus nidulans* (AAD30065), or the chorismate mutase from *Arabidopsis thaliana* described below, or the chorismate mutase activity of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase (tyrA) from *E. coli* described below.

In a preferred embodiment, chorismate mutase genes are used that encode a chorismate mutase whose activity is subject to a reduced posttranslational regulation in the organism. The term reduced regulation refers to a regulation of the activity of no more than 99 %, preferably of no more than 70 %, very preferably of 50 %, particularly preferably of 0 %, that is, no regulation of the activity, in comparison with the wild type regulation.

Chorismate mutase genes that encode a chorismate mutase whose activity in the organism is subject to a reduced, in particular no regulation, include chorismate mutase genes from organisms of a different type or chorismate mutase genes from the same organism or organisms of a related type that are subject to a reduced, in particular no posttranslational regulation in the localization of the expression.

According to the invention, the term organisms refers to prokaryotic or eukaryotic organisms, such as bacteria, yeasts, algae, mosses, fungi or plants, that are capable of producing the fine chemicals mentioned above either as wild types or by genetic modification. Preferred organisms are photosynthetically active organisms, such as cyanobacteria, mosses, algae or plants, that as wild types are already capable of producing the fine chemicals mentioned above.

Especially preferred organisms are plants.

In a further preferred embodiment of measure A of the method according to the invention, chorismate mutase genes that encode a chorismate mutase whose activity in plants is subject to a reduced posttranslational regulation are inserted into plants.

For example, these are some bacterial or hereof derived chorismate mutase genes, that is, nucleic acids encoding a protein, containing the amino acid sequence of a bacterial chorismate mutase whose activity in plants is subject to a reduced posttranslational regulation, for example the nucleic acid described below, encoding for the chorismate mutase activity of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase (tyrA) from *E. coli* or a sequence derived from this sequence by substitution, insertion or deletion of amino acids that exhibit a homology on the amino acid level of at least 30 %, preferably of at least 50%, more preferably of at least 70 %, particularly preferably of at least 90 % with the sequence of the bacterial chorismate mutase and the enzymatic property of a chorismate mutase.

In the description, the term "substitution" refers to the replacement of one or more amino acids by one or more amino acids. So-called conservative substitutions are carried out with preference, where the substituted amino acid has a similar property as the original amino acid, for example the substitution of Glu by Asp, Gln by Asn, Val by Ile, Leu by Ile, Ser by Thr.

Deletion is the replacement of an amino acid by a direct bond. Preferred positions for deletions are the termini of the polypeptides and the linkages between the individual protein domains.

Insertions are insertions of amino acids into the polypeptide chain, where a direct bond is formally substituted by one or more amino acids.

The term homology between two proteins refers preferably to the identity of the amino acids across the entire respective length of the proteins, preferably to the identity that is calculated by means of comparison with the help of the program algorithm GAP (UWGCG, University of Wisconsin, Genetic Computer Group) by setting the following parameters:

Gap Weight:	12
Length Weight:	4
Average Match:	2.912
Average Mismatch:	-2.003



Accordingly, a protein exhibiting a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence of the chorismate mutase from *E. coli* described above refers to a protein exhibiting a homology of at least 30 % in a comparison of its sequence with the sequence of the chorismate mutase described above, preferably according to the above program algorithm with the above set of parameters.

The bacterial or hereof derived chorismate mutase genes may also encode proteins exhibiting the property of a chorismate mutase and the property of a further enzyme, such as the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase gene (*tyrA*) from *E. coli* K12. This version is particularly preferred, as described below, if the measures A and B are carried out in combination.

In a particularly preferred embodiment of measure A of the method according to the invention, in particular in the event that only measure A is carried out, the chorismate mutase genes are inserted to specific locations in the organism where the corresponding chorismate mutases are subject to a reduced posttranslational regulation.

Here, nucleic acids encoding a chorismate mutase from the same or from related organisms are preferably used, being subject to a reduced posttranslational regulation at the location of the expression.

The isoforms of chorismate mutases that are isolated from different compartments of an organism exhibit a different regulation.

The corresponding chorismate mutase genes from a specific compartment of the organism or from related organisms may be inserted into other compartments of the organism in which the encoded chorismate mutases are not subject to any posttranslational regulation.

In a particularly preferred version of the method according to the invention in plants, a nucleic acid encoding a cytosolic chorismate mutase from plants is inserted into plastids of plants for the execution of measure A.

In principle, any nucleic acid encoding a cytosolic chorismate mutase from plants is suitable for this purpose, preferably the nucleic acid encoding a cytosolic chorismate mutase from *Arabidopsis thaliana* (Seq ID No. 3) and natural or non-natural nucleic acids derived thereof.

It has been possible to prove the existence of different isoforms of the chorismate mutase for various organisms. Thus, it has been possible to isolate three different chorismate mutases from *Arabidopsis thaliana* (Eberhard et al. 1993. FEBS 334, 233-236; Eberhard et al. 1996. Plant J. 10, 815-821; Mobley et al. 1999. Gene 15; 240 (1): 115-123).

These isoforms differed both in their localization and in their enzymatic properties. Thus, the chorismate mutase-1 is plastidically localized and allosterically controlled by the aromatic amino acids.

The cytosolic isoenzyme chorismate mutase-2 is not subject to any known regulation (Benesova, M. Bode, R, Phytochemistry 1992, 31, 2983-2987).

Nucleic acids encoding a cytosolic chorismate mutase from *Arabidopsis thaliana* and natural or non-natural nucleic acids derived therefrom refer to nucleic acids that encode a protein containing the amino acid sequence of the cytosolic chorismate mutase (SEQ ID NO. 4) or a sequence derived from this sequence by substitution, insertion or deletion of amino acids exhibiting a homology of at least 30 %, preferably of at least 50 %, more preferably of at least 70 %, particularly preferably of at least 90 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 4 and the enzymatic property of a chorismate mutase.

Accordingly, a protein exhibiting a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 4 refers to a protein that exhibits a homology of at least 30 % in a comparison of its sequence with the sequence SEQ ID NO. 4, preferably according to the above program algorithm with the above set of parameters.

In another preferred embodiment of the method according to the invention, a nucleic acid encoding the cytosolic chorismate mutase from *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO. 4) is inserted into plastids of plants.

Suitable nucleic acid sequences are obtainable by retranslation of the polypeptide sequence according to the genetic code, for example.

Codons that are frequently used in accordance with the plant-specific codon usage are preferably used for this purpose. The codon usage can be determined easily with the help of computer analyses of other known genes of the respective plant.

In another particularly preferred embodiment of the method according to the invention, a nucleic acid of the sequence SEQ ID NO. 3 is inserted into plastids of plants. The sequence SEQ ID NO. 3 represents the gene of the cytosolic chorismate mutase from *Arabidopsis thaliana* (chorismate mutase-2).

For example, the insertion of the nucleic acids encoding a chorismate mutase in plastids of plants may be achieved, as described in more detail below for the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, by inserting expression cassettes into plants whose nucleic acid sequence encodes for a chorismate mutase fusion protein, with a part of the fusion protein being a transit peptide regulating the translocation of the polypeptide. Specific transit peptides that are split off enzymatically from the chorismate mutase part after the translocation of the cytosolic chorismate mutase into the chloroplasts are preferred for the chloroplasts.

In another particularly preferred embodiment of the method according to the invention, a nucleic acid construct is therefore inserted into the plant, containing a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide and a nucleic acid that encodes a protein, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 4 or a sequence derived from this sequence by substitution, insertion or deletion of amino acids, which exhibits a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 2 and the enzymatic property of a chorismate mutase.

Nucleic acids encoding plastidic transit peptides are, for example, DNA sequences of three cassettes of the plastids transit peptide of the plastidic transketolase from tobacco in three reading grids as KpnI/BamHI fragments with an ATG codon in the NcoI interface:

[Sequence omitted]

[Sequences omitted]

or the nucleic acid encoding the plastidic transit peptide of the plastidic chorismate mutase-1 from *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO. 7):

[Sequence omitted]

For the plastidic localization of a cytosolic chorismate mutase, the nucleic acid encoding the plastidic transit peptide of the plastidic chorismate mutase-1 from *Arabidopsis thaliana* is used preferably.

In another particularly preferred embodiment of the method according to the invention, a nucleic acid construct is therefore inserted into the plant, containing a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide of the plastidic chorismate mutase-1 from *Arabidopsis thaliana* and a nucleic acid that encodes a protein, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 4 or a sequence derived from this sequence by substitution, insertion or deletion of amino acids, which exhibits a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 4 and the enzymatic property of a chorismate mutase.

For measure A of the method according to the invention, a nucleic acid construct containing the sequence (SEQ ID NO. 5) is particularly preferred for insertion into plants.

SEQ ID NO. 5 represents a nucleic acid construct from the nucleic acid encoding the plastidic transit peptide of the plastidic chorismate mutase-1 from *Arabidopsis thaliana* and the nucleic acid encoding the cytosolic chorismate mutase-2 from *Arabidopsis thaliana*.

The present application concerns in particular these nucleic acid constructs, as well as their use in measure A of the method according to the invention.

For example, figure 1 shows the biosynthesis scheme starting from erythrose-4-phosphate to vitamin E. The shikimate pathway of the wild type is genetically modified by the additional expression of a chorismate mutase gene and the metabolite flow to hydroxyphenylpyruvate is increased. The hydroxyphenylpyruvate now available in increased quantities is further converted in the direction of tocopherols. An increased hydroxyphenylpyruvate content leads to an increased conversion in the direction of vitamin E and/or vitamin K. An increased hydroxyphenylpyruvate content preferably leads to an increase of the vitamin E content.

As described in detail below, an expression cassette is produced by fusion of a suitable promoter with a suitable chorismate mutase nucleic acid sequence and preferably a nucleic acid inserted between promoter and chorismate mutase nucleic acid sequence, where the nucleic acid encodes for a plastidic transit peptide, that is, preferably by fusion of a suitable promoter with a suitable nucleic acid construct described above, as well as a polyadenylation signal according to common recombination and cloning techniques, as described for instance in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) and in T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) and in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Measure B for the modification of the shikimate pathway of the wild type occurs, as described above, by inserting at least one gene into the organism for which the wild type exhibits no orthologous gene and which bypasses the metabolic pathway of the shikimate pathway of the wild type. This gene encodes an enzyme that effects an increase of the metabolite flow by means of the new enzymatic activity to the intermediate compound where the bypass ends. This new enzymatic activity is preferably not subject to any

regulation by the organism, i.e. it short-circuits the metabolic pathway in order to circumvent limiting regulation sites in the metabolism, for example. This makes it possible to uncouple the metabolite flow to limiting substances from existing regulations. 15A gene that is orthologous to the wild type refers to a gene that comes from another organism, whereby the enzymatic activity that the gene encodes is already present in the wild type.

Accordingly, the phrase "a gene to which the wild type does not exhibit an orthologous gene" refers to a gene from another organism, where the enzymatic activity the gene encodes was not present or activated in the wild type prior to the transformation.

A gene that is orthologous to the wild type refers preferably to a functional equivalent from another organism, whereby functional equivalent refers to the entirety of the properties of the gene product (protein).

Accordingly, the phrase "a gene to which the wild type does not exhibit an orthologous gene" refers preferably to a gene to which the wild type does not have a functional equivalent pursuant to the definition stated above and thus a metabolic performance is established that creates an alternative metabolic pathway in order to produce a product already present in the plant (contained metabolite).

According to the invention, as described above for measure A, the term organisms refers to prokaryotic organisms or eukaryotic organisms, such as bacteria, yeasts, algae, mosses, fungi or plants that are capable of producing the fine chemicals mentioned above either as wild types or by genetic modification. Preferred organisms are photosynthetically active organisms, such as cyanobacteria, mosses, algae or plants, that as wild types are already capable of producing the fine chemicals mentioned above.

Especially preferred organisms are plants.

In a particularly preferred embodiment of the method according to the invention, plants are therefore used as the organisms to be transformed. In this case, bacterial genes as genes to which the plant does not exhibit an orthologous gene are preferably suitable for the execution of measure B.



In a preferred embodiment of measure B of the method according to the invention, the metabolic pathway of the shikimate pathway of the plant is bypassed by the at least one inserted gene.

In a particularly preferred embodiment of measure B of the method according to the invention, a nucleic acid encoding a prephenate dehydrogenase is inserted into a plant. Any gene encoding a prephenate dehydrogenase is suitable for the preferred version of the method according to the invention.

The term prephenate dehydrogenase refers to an enzyme exhibiting the enzymatic activity of transmuting prephenate into 4-hydroxyphenylpyruvate.

Examples of nucleic acids encoding a prephenate dehydrogenase and capable of being used in the method according to the invention include the known prephenate dehydrogenase genes from *Lactococcus lactis* (Accession X78413), *Synechocystis spec PCC (slr2081)*, *Deinococcus radiodurans* (AAF10695) or *Bacillus subtilis* (P20692), which are accessible in Internet data banks, for example. Additional examples may be found by comparison of the homologies of the sequences with these known prephenate dehydrogenase genes, such as for example the potential prephenate dehydrogenases from *Thermotoga maritima* (AAD35430) or *Helicobacter pylori* 26695 (Accession AAD08422).

In a preferred embodiment of the method according to the invention using a prephenate dehydrogenase gene, a nucleic acid that encodes a protein is inserted, containing the amino acid sequence of the prephenate dehydrogenase from *Synechocystis spec PCC 6803* or a sequence derived from this sequence by substitution, insertion or deletion of amino acids, exhibiting a homology on the amino acid level of at least 30 %, preferably of at least 50 %, more preferably of at least 70 %, particularly preferably of at least 90 % with the sequence of the prephenate dehydrogenase from *Synechocystis spec PCC 6803* and the enzymatic property of a prephenate dehydrogenase.

Accordingly, a protein exhibiting a homology on the amino acid level of at least 30 % with the sequence of the prephenate dehydrogenase from *Synechocystis spec PCC 6803* refers to a protein exhibiting a homology of at least 30 % in a comparison of its sequence with the sequence of the prephenate dehydrogenase from *Synechocystis spec PCC 6803*, preferably according to the above program algorithm with the above set of parameters.

For example, figure 1 shows the biosynthesis scheme starting from erythrose-4-phosphate to the tocopherols. The shikimate pathway of the wild type is genetically modified and the metabolite flow to hydroxyphenylpyruvate is increased by the additional expression of a prephenate dehydrogenase gene. The hydroxyphenylpyruvate now available in increased quantities is further converted in the direction of tocopherols. An increased hydroxyphenylpyruvate content leads to an increased conversion in the direction of vitamin E and/or vitamin K. An increased hydroxyphenylpyruvate content preferably leads to an increase of the vitamin E content.

However, it is advantageous to overexpress additional enzymes of the shikimate pathway, if necessary in combination with the bypass of the metabolic pathway according to the invention, in order to achieve an increased metabolite flow to the desired fine chemicals.

In a further preferred embodiment of the method according to the invention, measures A and B are therefore carried out in combination.

In a particularly preferred embodiment of this variant of the method according to the invention, a nucleic acid encoding a prephenate dehydrogenase is inserted into a plant in combination with a nucleic acid encoding a chorismate mutase.

This combination may occur by inserting two nucleic acids, for example, which encode one enzyme with the activity of a chorismate mutase and one enzyme with the activity of a prephenate dehydrogenase, respectively. For this version it is necessary to insert two different nucleic acids into the plant, each encoding one of these respective enzymes.

In a particularly preferred embodiment of the method according to the invention, this combination occurs in a nucleic acid by inserting a nucleic acid encoding a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase into a plant.

The chorismate mutase-prephenate dehydrogenase gene encodes a protein that exhibits the enzymatic properties of both a chorismate mutase and a prephenate dehydrogenase. Thus by inserting a nucleic acid, an enzymatic activity is overexpressed and/or an enzymatic activity is inserted that is subject to a reduced posttranslational regulation (chorismate mutase) and an enzymatic property (prephenate dehydrogenase) is newly introduced.



The term chorismate mutase-prephenate dehydrogenase refers to an enzyme that exhibits the enzymatic activity of transmuting chorismate into 4-hydroxyphenylpyruvate.

In a further, particularly preferred embodiment of this variant of the method according to the invention, a nucleic acid that encodes a protein is inserted, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 or a sequence derived from this sequence by substitution, insertion or deletion of amino acids exhibiting a homology of at least 30 %, preferably of at least 50 %, more preferably of at least 70 %, particularly preferably of at least 90 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 2 and the enzymatic property of a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase.

The protein with the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 represents the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase (tyrA) from *E. coli* K12.

Accordingly, a protein exhibiting a homology on the amino acid level of at least 30 % with the sequence SEQ ID NO. 2 refers to a protein exhibiting a homology of at least 30 % in a comparison of its sequence with the sequence SEQ ID NO. 2, preferably according to the above program algorithm with the above set of parameters.

Any nucleic acid mentioned in the description may be a RNA, DNA or cDNA sequence, for example.

Suitable nucleic acid sequences are obtainable by retranslation of the polypeptide sequence according to the genetic code, as described above.

Codons that are frequently used in accordance with the organism-specific codon usage are preferably used for this purpose. The codon usage can be determined easily with the help of computer analyses of other, known genes of the respective organism.

If the protein is to be expressed in a plant, for example, then it is frequently advantageous to use the codon usage of the plant in the retranslation.

Further preferred chorismate mutase-prephenate dehydrogenases and/or their encoding nucleic acids are in particular nucleic acids of bacterial origin, such as for example the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Erwinia herbicola*

(Accession X60420; this protein can also be converted into a monofunctional prephenate dehydrogenase by deletion of a 109 Bp area at the 5' end and can then be used as a prephenate dehydrogenase, as described above) or from *Bordetella bronchiseptica* (Accession AAF01289), or they can be found easily from various organisms whose genomic sequence is known by means of homology comparisons of the amino acid sequences or the corresponding retranslated nucleic acid sequences from data banks with the SEQ ID NO. 2 or the other sequences described above, such as for example the potential chorismate mutase-prephenate dehydrogenase genes from *Methanococcus janaschii* (Accession Q58029).

Particularly preferred nucleic acids being used encode a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from bacteria.

A particularly preferred nucleic acid being used has the sequence SEQ ID NO. 1. This nucleic acid represents a prokaryotic genomic DNA from *E. coli* K12 that encodes the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase of sequence SEQ ID NO. 2, also called *tyrA* gene.

For example, figure 1 shows the biosynthesis scheme starting from erythrose-4-phosphate to the tocopherols. The shikimate pathway of the wild type is genetically modified and the metabolite flow to hydroxyphenylpyruvate is increased by means of the additional expression of a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase gene. The hydroxyphenylpyruvate now available in increased quantities is further converted in the direction of tocopherols. An increased hydroxyphenylpyruvate content leads to an increased conversion in the direction of vitamin E and/or vitamin K. An increased hydroxyphenylpyruvate content preferably leads to an increase of the vitamin E content in the method according to the invention.

In the method according to the invention for the production of fine chemicals, the step of cultivating the transgenic organisms is preferably followed by the harvesting of the organisms and the isolating of the fine chemicals from the organisms.

The harvesting of the fine chemicals occurs in the manner known per se according to the respective organism. Microorganisms, such as bacteria, mosses, yeasts, fungi or plant cells that are cultivated by fermentation in liquid nutritional media may be separated by centrifugation, decanting or filtration, for example. Plants are grown on nutritional soil in the manner known per se and harvested accordingly.

The isolation of the fine chemicals from the harvested biomass occurs in the manner known per se, for example by extraction and, if necessary, by additional chemical or physical purification processes, such as precipitation methods, crystallography, thermal separation procedures, such as rectification procedures, or physical separation procedures, such as chromatography.

The isolation of vitamin E from oleaginous plants occurs for example preferably by chemical transmutation and distillation from vegetable oils or from the steam distillate generated in the desodorization of vegetable oils (steam condensates).

Additional methods of isolating vitamin E from steam condensates are described in DE 31 26 110 A1, EP 171 009 A2, GB 2 145 079, EP 333 472 A2 and WO 94/05650, for example.

The production of the transgenic organisms, in particular plants, occurs preferably by transformation of the starting organisms, in particular plants, with a nucleic acid construct containing the nucleic acids described above, in particular the nucleic acids encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, or the nucleic acid constructs described above, in particular the nucleic acid construct encoding for a plastidic transit peptide and a cytosolic chorismate mutase, whereby these nuclei acids [sic]

These nucleic acid constructs in which the encoding nucleic acid sequence or the encoding nucleic acid construct are functionally linked with one or more regulation signals that ensure the transcription and translation in organisms, in particular in plants, are hereafter also called expression cassettes.

Accordingly, the invention also relates to nucleic acid constructs acting as expression cassettes, containing a previously described nucleic acid, in particular the nucleic acid encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, or the nucleic acid constructs described above, in particular the nucleic acid construct encoding for a plastidic transit peptide and a cytosolic chorismate mutase, which are functionally linked with one or more regulation signals that ensure the transcription and translation in the host organism, in particular in plants.

The expression cassette preferably contains a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide that ensures the localization in plastids.

The expression cassettes incorporate regulation signals, that is, regulative nucleic acid sequences controlling the expression of the encoding sequence in the host cell. According to a preferred embodiment, an expression cassette includes upstream, i.e. at the 5' end of the encoding sequence, a promoter and downstream, that is, at the 3' end, a polyadenylation signal and additional regulatory elements, if necessary, which are operatively linked with the encoding sequence lying in between for at least one of the genes described above. An operative linkage refers to the sequential arrangement of promoter, encoding sequence, terminator and, if necessary, further regulative elements in such a manner that each of the regulative elements is capable of fulfilling its function in the expression of the encoding sequence in accordance with the requirements.

The preferred nucleic acid constructs, expression cassettes for plants and methods for the production of transgenic plants are exemplified below.

The sequences that are preferred for but not limited to the operative linkage are targeting sequences to ensure the subcellular localization in the apoplast, in the vacuole, in plastids, in the mitochondrion, in the endoplasmatic retikulum (ER), in the cell nucleus, in elaisomes or other compartments, and translation intensifiers, such as the 5' lead sequence from the tobacco mosaic virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

In principle, any promoter capable of controlling the expression of foreign genes in plants is suitable as a promoter of the expression cassette. A plant promoter or a promoter coming from a plant virus is used preferably. Preferred in particular is the CaMV 35S promoter from the cauliflower mosaic virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). It is known that this promoter contains different detection sequences for transcriptional effectors which, as a whole, result in a permanent and constitutive expression of the introduced gene (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

The expression cassette may also contain a chemically inducible promoter by means of which the expression of the exogenous tyrA gene in the plant can be controlled at a specific moment. For example, such promoters as the PRP1

promoter (Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993), 361-366), a promoter inducible by means of salicylic acid (WO 95/19443), a promoter inducible by means of benzenesulfonamide (EP-A 388186), a promoter inducible by means of tetracycline (Gatz et al., (1992) *Plant J.* 2, 397-404), a promoter inducible by means of abscisic acid (EP-A 335528) or a promoter inducible by means of ethanol or cyclohexanone may be used, among others.

In addition, preferred are those promoters in particular that ensure the expression in the tissue or parts of plants where, for example, the biosynthesis of the corresponding fine chemicals, in particular vitamin E or its preliminary stages takes place. One should particularly mention the promoters that ensure a leaf-specific expression. The promoter of the cytosolic FBPase from potatoes or the ST-LSI promoter from potatoes (Stockhaus et al., *EMBO J.* 8, (1989), 2445-245) should be mentioned.

With the help of a seed-specific promoter, it has been possible to express a foreign protein in a stable manner up to a portion of 0.67 % of the entire soluble seed protein in the seed of transgenic tobacco plants (Fiedler and Conrad, *Bio/Technology* 10 (1995), 1090-1094). The expression cassette may thus for example contain a seed-specific promoter (preferably the phaseoline promoter (US 5504200), the USP promoter (Baumlein, H. et al., *Mol. Gen. Genet.* (1991) 225 (3), 459-467), the LEB4 promoter (Fiedler and Conrad, 1995), the sucrose-bonding protein promoter (quotation), the LEB4 signal peptide, the gene to be expressed and an ER retention signal.

The production of an expression cassette occurs preferably by fusion of a suitable promoter with a suitable nucleic acid sequence described above, in particular the nucleic acid sequence encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, and preferably a nucleic acid inserted between a promoter and a nucleic acid sequence encoding for a chloroplast-specific transit peptide, and with a polyadenylation signal according to common recombination and cloning techniques, as described for example in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) and in T.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) and in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).



In particular preferred are inserted sequences that ensure a targeting in the plastids, as described above for the chorismate mutase.

Furthermore, expression cassettes whose nucleic acid sequence encodes for a fusion protein, in particular a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase fusion protein, may also be used, whereby a part of the fusion protein is a transit peptide controlling the translocation of the polypeptide. For the chloroplasts, specific transit peptides are preferred that are enzymatically separated into the chloroplasts of the protein part, in particular of the chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase part, following the translocation of the proteins, in particular the chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase. In particular preferred is the transit peptide that is derived from the plastidic *Nicotiana tabacum* transketolase or another transit peptide (e.g. the transit peptide of the small subunit of the rubisco or ferredoxin NADP oxidoreductase, as well as of the isopentenyl pyrophosphate isomerase-2) or its functional equivalent.

For the use of the cytosolic chorismate mutase or of the nucleic acid encoding a cytosolic chorismate mutase as described above, the use of the transit peptide of the plastidic chorismate mutase or of its encoding nucleic acid is preferred in particular.

Particularly preferred in the use according to the invention of the other nucleic acids according to the invention are DNA sequences of three cassettes of the plastid transit peptide of the plastidic transketolase from tobacco in three reading grids as KpnI/BamHI fragments with an ATG codon in the NcoI interface:

[Sequence omitted]

[Sequences omitted]

Another example for a plastidic transit peptide is the transit peptide of the plastidic isopentenyl pyrophosphate isomerase-2 (IPP-2) from *Arabidopsis thaliana*.

The nucleic acids according to the invention, in particular the nucleic acids encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, may be produced synthetically or extracted naturally or contain a mixture of synthetic and natural nucleic acid components, and may consist of different heterologous gene sections of different organisms.

As described above, synthetic nucleotid sequences with codons preferred by plants are preferred. These codons preferred by plants may be determined from codons with the highest protein frequency that are expressed in the majority of interesting plant species.

In the preparation of an expression cassette, different DNA fragments may be manipulated in order to obtain a nucleotid sequence expediently reading in the correct direction and equipped with a correct reading grid. Adapters or linkers may be attached to the fragments for the connection of the DNA fragments with each other.

The promoter and terminator regions in the transcription direction may expediently be provided with a linker or polylinker containing one or more restriction sites for the insertion of this sequence. As a rule, the linker has 1 to 10, usually 1 to 8, preferably 2 to 6 restriction sites. In general, within the regulatory regions the linker has a

size of less than 100 bp, frequently less than 60 bp, at least 5 bp, however. The promoter may be both native or homologous and foreign or heterologous with respect to the host plant. The expression cassette includes, preferably in the 5'-3' transcription direction, the promoter, an encoding nucleic acid sequence or a nucleic acid construct and a region for the transcriptional termination. Different termination areas are mutually interchangeable in any order.

Furthermore manipulations may be deployed that provide matching restriction interfaces or remove the superfluous DNA or restriction interfaces. Where insertions, deletions or substitutions, such as transitions and transversions, are possible, *in vitro* mutagenese, "primer repair", restriction or ligation may be used.

In the case of suitable manipulations, such as for example restriction, "chewing back" or filling up of overhangs for "blunt ends," complementary ends of the fragments may be provided for the ligation.

Preferred polyadenylation signals are vegetable polyadenylation signals, preferably those that essentially correspond to T-DNA polyadenylation signals from *Agrobacterium tumefaciens*, in particular of the gene 3 of the T-DNA (octopine synthase) of the Ti plasmid pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff.) or functional equivalents.

Furthermore, the invention relates to the use of the nucleic acids described above, in particular to the use of the nucleic acids encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, or of the nucleic acid constructs or proteins described above, in particular of the chorismate mutases, prephenate dehydrogenases or chorismate mutase-prephenate dehydrogenases for the production of transgenic plants.

These transgenic plants preferably exhibit an increased fine chemicals content in relation to the wild type, in particular with respect to ubiquinone, vitamin E and/or vitamin K, preferably vitamin E.

It is known that plants with a high vitamin E content exhibit increased resistance to abiotic stress. The term abiotic stress refers to cold, frost, drought, heat and salt, for example.



Thus, the invention also relates to the use of the nucleic acids mentioned above for the production of transgenic plants exhibiting increased resistance to abiotic stress in relation to the wild type.

The proteins and nucleic acids described above may be used for the production of fine chemicals in transgenic organisms, preferably for the production of vitamin E, vitamin K and/or ubiquinone, in particular vitamin E in transgenic plants.

The transmission of foreign genes into the genome of an organism, in particular of a plant, is called transformation. For this purpose, methods known per se for the transformation and regeneration of plants from plant tissue or plant cells may be used for the transient or stable transformation, in particular in the case of plants.

Suitable methods for the transformation of plants include the protoplast transformation by means of polyethylen glycol-induced DNA uptake, the biolistic procedure with the gene gun – the so-called particle bombardment method, electroporation, incubation of dry embryos in DNA-containing solution, microinjection and gene transfer mediated by agrobacterium as described above. The methods mentioned here are described in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143, and in Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225, for example.

The construct to be expressed is preferably cloned into a vector that is suitable for transforming *Agrobacterium tumefaciens*, for example pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711).

Accordingly, the invention further relates to vectors containing the nucleic acids, nucleic acid constructs or expression cassettes described above.

Agrobacteria transformed with an expression cassette may be used in the known manner for the transformation of plants, for example by bathing injured leaves or pieces of leaves in an agrobacterial solution and by cultivating them in suitable media afterwards.

In addition to plants, the expression cassette may also be deployed for the transformation of bacteria, in particular cyanobacteria, mosses, yeasts, filamentous fungi and algae.

For the preferred production of genetically modified plants, hereinafter also called transgenic plants, the fused expression cassette encoding a protein according to the invention, in particular a chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, is preferably cloned into a vector, for example pBin19, which is suitable for transforming *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacteria* transformed with such a vector may then be used in a known manner for the transformation of plants, in particular cultivated plants, for example by bathing injured leaves or pieces of leaves in an *agrobacterial* solution and by cultivating them in suitable media afterwards.

The transformation of plants by means of *agrobacteria* is known from F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, edited by S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38, among others. Transgenic plants may be regenerated from the transformed cells of the injured leaves or pieces of leaves in a known manner, which contain a gene integrated into the expression cassette for the expression of a gene according to the invention, in particular a nucleic acid encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase.

For the transformation of a host plant with a nucleic acid encoding for a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, an expression cassette as insertion is inserted into a recombinant vector whose vector DNA contains additional functional regulation signals, for example sequences for replication or integration. Suitable vectors are described in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Ch. 6/7, pp. 71-119 (1993), among others.

As an example, the plant expression cassette may be inserted into a derivative of the transformation vector pBin-19 with 35s promoter (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)). Figure 2 shows a derivative of the transformation vector pBin-19 with seed-specific legumin B4 promoter.

The expression cassettes may be cloned into suitable vectors by using the recombination and cloning techniques cited above, which facilitate their multiplication, for example in *E. coli*. Suitable cloning vectors include pBR332, pUC series, M13mp series and pACYC184, among others. Particularly suitable are binary vectors that can replicate both in *E. coli* and in agrobacteria.

Thus the invention relates to the use of the nucleic acids described above, in particular the nucleic acids encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, of the nucleic acid constructs described above, in particular of the expression cassettes for the production of genetically modified plants or for the transformation of plants, plant cells, plant tissue or parts of plants. Preferably, the objective of the use is the increase of the fine chemicals content of the plant or plant parts, in particular the increase of the vitamin E, vitamin K or ubiquinone content, preferably vitamin E.

Depending on the choice of promoter, the expression may occur specifically in the leaves, seeds, petals or other parts of the plant.

Accordingly, the invention furthermore relates to a method for the production of genetically modified organisms by inserting a nucleic acid described above or a nucleic acid construct described above into the genome of the starting organism.

Preferably, the invention relates to a method for the transformation of a plant, characterized in that expression cassettes containing nucleic acid sequences encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, are inserted into a plant cell or into protoplasts of plants, regenerating them into whole plants.

The invention also relates to the genetically modified organisms, with the genetic modification changing the metabolite flow of the shikimate pathway in relation to the wild type and the organism exhibiting an altered fine chemicals content in relation to the wild type.

As mentioned above, preferred genetically modified organisms exhibit an increased fine chemicals content, in particular an increased content of vitamin E, vitamin K and ubiquinone, preferably an increased vitamin E content in relation to the wild type.

According to the invention, the term genetically modified organism refers in particular to an organism where the gene expression of a nucleic acid encoding a chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, in relation to a wild type is either

increased by the genetic modification where the starting organism contains the corresponding nucleic acid, or

caused by the genetic modification where the starting organism does not contain the corresponding nucleic acid.

In a preferred embodiment, as mentioned above, photosynthetically active organisms such as cyanobacteria, mosses, algae or plants, especially preferably plants, are used as starting organisms and accordingly also as genetically modified organisms for the production of organisms with an increased fine chemicals content in relation to the wild type.

Such transgenic plants, their reproductive material and their plant cells, plant tissue or plant parts are a further subject of the present invention.

Plants within the meaning of the invention are, in particular, monocotyle and dicotyle plants.

Preferred plants include *Tagetes*, sunflower, *Arabidopsis*, tobacco, red pepper, soybean, tomato, aubergine, capsicum, carrot, potato, maize/corn, lettuces and cabbage types, grains, alfalfa, oat, barley, rye, wheat, triticales, sorghum, rice, lucerne, flax, cotton, hemp, Brassicaceae, such as rapeseed or canola for example, sugar beet, sugar cane, nuts and vine species or wood plants such as aspen or yew.

Particularly preferred are *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, canola, potatoes as well as additional oil seeds, such as soybean.

The genetically modified organisms, in particular plants, may be used for the production of fine chemicals, in particular for the production of vitamin E, vitamin K and ubiquinone, as described above.

Genetically modified plants according to the invention, edible by human beings and animals, with an increased fine chemicals content, in particular with an increased content of vitamin E, ubiquinone and/or vitamin K, preferably vitamin E, may also be used directly or following a processing treatment known per se as food or feed.

In the context of the present invention, the term increase of the fine chemicals content means the artificially acquired capability of an increased biosynthetic output of these compounds in the plant in relation to the plant not modified by gene technology for the duration of at least one plant generation.

As a rule, an increased content of vitamin E refers to an increased content of total tocopherol. However, an increased content of vitamin E also refers in particular to an altered content of the 8 compounds with tocopherol activity described above.

For example, inserting a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase gene into plants surprisingly results in a particularly strong increase of the tocopherol content.

In the event of an increase of the vitamin E content, both the content of tocopherols or tocotrienols may be increased. Preferably, the tocopherols content is increased. But it is also possible under certain conditions to increase preferably the content of tocotrienols .

The biosynthesis location of vitamin E, for example, is the leaf lamina in plants, among other areas, so that a leaf-specific expression of the nucleic acids according to the invention, in particular of the nucleic acids encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase, is appropriate. However, this is not a limiting factor since the expression may also occur tissue-specifically in all other parts of the plant, particularly in fat-containing seeds.

A further preferred embodiment relates therefore to a seed-specific expression of the nucleic acids according to the invention, in particular of the nucleic acids encoding a chorismate mutase, a prephenate dehydrogenase or a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase.

In addition, a constitutive expression of exogenous chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase genes is advantageous. On the other hand, an inducible expression may also be desirable.

The effectiveness of the expression of the transgenically expressed chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase gene may be determined *in vitro* by shoot meristem reproduction, for example. In addition, an expression of the chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase gene which is modified in type and height and its effect on the vitamin E biosynthesis performance may be tested on test plants in greenhouse experiments.

The invention is explained in more detail by the following examples, but is not limited to those listed:

General experimental conditions:  
Sequence analysis of recombinant DNA

The sequencing of recombinant DNA molecules occurred with a laser fluorescence DNA sequencer made by Licor (distributed by MWG Biotech, Ebersbach) according to the method of Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Example 1 – Cloning of the *tyrA* gene encoding for the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12.

The DNA encoding for the *tyrA* gene was amplified by means of *polymerase chain reaction (PCR)* from *E. coli* K12, using a sense-specific primer (*tyrA*5' SEQ ID NO. 10) and an antisense-specific primer (*tyrA*3' SEQ ID NO. 9).

The PCR conditions were the following:

The PCR occurred in a 50  $\mu$ l reaction approach which included:

- 2  $\mu$ l of an *E. coli* K12 cell suspension
- 0.2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1.5 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>
- 5  $\mu$ g bovine serum albumine
- 40 pmol *tyrA*5'
- 40 pmol *tyrA*3'
- 15  $\mu$ l 3.3  $\times$  rTth DNA polymerase XLbuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 U rTth DNA polymerase XL (PE Applied Biosystems)



The PCR was performed under the following cycle conditions:

Step 1: 5 minutes 94° C (denaturation)

Step 2: 3 seconds 94° C

Step 3: 1 minute 55 °C (annealing)

Step 4: 2 minutes 72 °C (elongation)

30 repetitions of steps 2 to 4

Step 5: 10 minutes 72 °C (post-elongation)

Step 6: 4 °C (waiting cycle)

The amplicon was cloned into the PCR cloning vector pGEM-T (Promega) by using standard methods. The identity of the generated amplicon was confirmed by sequencing, using the M13F (-40) primer.

Example 2 – Production of expression cassettes containing the *tyrA* gene encoding for the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12.

Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants were generated that express the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12 under the control of the constitutive 35S promoter of the CaMV (cauliflower mosaic virus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980). The basis of the plasmid generated for the constitutive expression of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12 was the pBinAR-TkTp-10 (Ralf Badur, dissertation Universität Göttingen, 1998). This vector is a derivative of the pBinAR (Höfgen and Willmitzer, Plant Sci. 66: 221-230, 1990) and contains the 35S promoter of the CaMV (cauliflower mosaic virus) (Franck et al., 1980) and the termination signal of the octopine synthase gene (Gielen et al., EMBO J 3: 835-846, 1984) as well as the DNA sequence encoding for the transit peptide of the *Nicotiana tabacum* plastidic transketolase. The cloning of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12 into this vector, having occurred by taking the correct reading grid into account, generates a translation fusion of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase with the plastidic transit peptide. This causes a transport of the transgene into the plastids.

In order to produce this plasmid, the *tyrA* gene was isolated by using the flanking *Sma*I or *Sal*I restriction interfaces from the plasmid pGEM-T/*tyrA*. This fragment was ligated into a *Sma*I / *Sal*I sliced pBinAR-TkTp-10, using standard methods (see Fig. 2). This plasmid (pBinAR-TkTp-10/*tyrA*) was used to generate transgenic *Nicotiana tabacum* and *A. thaliana* plants.

Fragment A (529 bp) in figure 2 includes the 35S promoter of the CaMV (nucleotids 6909 to 7473 of the cauliflower mosaic virus), fragment B (245bp) encodes for the transit peptide of the *Nicotiana tabacum* transketolase, fragment C (1232 Bp) encodes for the tyrA gene from *E. coli* K12, fragment D (219Bp) encodes for the termination signal of the octopine synthase gene.

Example 3 – Generating nucleic acid constructs for the expression of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12 under the control of a seed-specific promoter.

In order to produce chimeric DNA constructs for the generation of transgenic *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* or *Brassica napus* plants expressing the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12 under the control of a seed-specific promoter, the vector pPTVkanLeP-IPP-TP-9 was used.

This vector is a derivative of the pGPTVkan (D. Becker, E. Kemper, J. Schell, R. Masterson. Plant Molecular Biology 20: 1195-1197, 1992) from which the uidA gene was deleted. Instead, the vector pPTVkanLeP-IPP-TP-9 contains the seed-specific promoter of the legumin B4 gene (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14 (6): 2707-2720, 1986), the sequence encoding for the transit peptide of the *A. thaliana* plastid-specific isopentenyl pyrophosphate isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unpublished) and the termination signal of the nopaline synthase from *A. tumefaciens* (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1, 561-73, 1982).

The nucleic acid fragment encoding for the tyrA from *E. coli* K12 was cloned as SmaI/SalI fragment with blunt ends replenished by the T4 polymerase into the vector pPTVkanLeP-IPP-TP-9 (Figure 3), whereby a translation fusion with the transit peptide of the IPP-2 was generated. Thus, it was possible to ensure an import of the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase into the plastids. This plasmid (pPTVkanLeP-IPP-TP-9/tyrA) was used to generate transgenic *Nicotiana tabacum*, *A. thaliana* or *Brassica napus* plants.

Fragment A (2700 bp) in figure 3 includes the promoter of the legumin B4 gene from *Vicia faba*, fragment B (206bp) encoding for the transit peptide of the *A. thaliana* isopentenyl pyrophosphate isomerase-2. Fragment C (1234Bp) encodes for the tyrA gene from *E. coli* K12. Fragment D (272Bp) for the termination signal of the nopaline synthase gene.



Example 4 – Production of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing the tyrA gene.

Wild type *Arabidopsis thaliana* plants (Columbia) were transformed with the *Agrobacterium tumefaciens* strain (GV3101 [pMP90]) on the basis of a modified vacuum infiltration method (Steve Clough and Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *A. thaliana*. Plant J 16(6): 735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. and Pellier, G., in: Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CRAcad Sci Paris, 1993, 1144(2): 204-212). The *Agrobacterium tumefaciens* cells used had been transformed with the plasmids pBinAR-TkTp-10/tyrA or pPTVkanLeP-IPP-TP-9/tyrA in advance (Figure 2 or 3).

Seeds of the primary transformants were selected on the basis of the resistance to antibiotics. Antibiotics-resistant seedlings were planted in soil and used as fully developed plants for the biochemical analysis.

Example 5 – Production of transgenic *Brassica napus* plants expressing the tyrA gene.

The production of transgenic rapeseed plants was centered on a protocol by Bade, J.B. and Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. and Spangenberg, G., eds., Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) in which the composition of the media and buffers used is also listed.

The transformations were carried out with the *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 [pMP90]. The plasmid pPTVkanLeP-IPP-TP-9/tyrA was used for the transformation (Figure 3). Seeds from *Brassica napus* var. Westar were made surface-sterile with 70 % ethanol (v/v), washed in water for 10 minutes at 55 °C, incubated in 1 % hypochlorite solution (25 % v/v Teepol, 0.1 % v/v Tween 20) for 20 minutes and washed six times with sterile water for a period of 20 minutes each. The seeds were dried on filter paper for three days and 10-15 seeds were brought to germination in a glass flask with 15 ml germination medium. The roots and apices were removed from several seedlings (approximately 10 cm high), and the remaining hypocotyls were cut into pieces with a length of approximately 6 mm. The approximately 600 explants thus generated were washed with 50 ml basal medium for 30 minutes and transferred to a 300 ml flask. Following the addition of 100 ml callus induction medium, the cultures were incubated at 100 rpm for a period of 24 hours.

An overnight culture in Luria Broth medium with kanamycin (20 mg/l) was prepared from the agrobacterial strain, and hereof 2 ml incubated in 50 ml Luria Broth medium without kanamycin for 4 hours at 29 °C up to an OD<sub>600</sub> of 0.4 to 0.5. After the pelletizing of the culture at 2000 rpm for 25 minutes, the cell pellet was resuspended in 25 ml basal medium. The concentration of the bacteria in the solution was set to an OD<sub>600</sub> of 0.3 by adding more basal medium.

The callus induction medium was removed from the rapeseed explants with sterile pipettes, 50 ml agrobacterial solution were added, carefully mixed and incubated for 20 minutes. The agrobacterial suspension was removed, the rapeseed explants were washed with 50 ml callus induction medium for one minute and 100 ml callus induction medium were subsequently added. The co-cultivation was performed for a period of 24 hours on a rotation shaker at 100 rpm. The co-cultivation was stopped by removing the callus induction medium and the explants were washed twice for one minute each with 25 ml washing medium and twice for 60 minutes each with 100 ml washing medium at 100 rpm. The washing medium with the explants was transferred to 15 cm petri dishes and the medium was removed with sterile pipettes.

For the regeneration, 20 to 30 explants each were transferred to 90 mm petri dishes containing 25 ml shoot induction medium with kanamycin. The petri dishes were closed with two layers of Leukopor and incubated at 25 °C and 2000 lux at photoperiods of 16 hours light / 8 hours darkness. Every 12 days the developing calli were transferred to fresh petri dishes with shoot induction medium. All other steps for the regeneration of entire plants were performed as described by Bade, J.B. and Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. and Spangenberg, G., eds., Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38).

Example 6 – Production of transgenic *Nicotiana tabacum* plants expressing the tyrA gene.

10 ml YEB medium with antibiotic (5 g/l bovine extract, 1 g/l yeast extract, 5 g/l peptone, 5 g/l saccharose and 2 mM MgSO<sub>4</sub>.) were vaccinated with a colony of *Agrobacterium tumefaciens* and cultivated overnight at 28 °C. The cells were pelletized at 4 °C, 3500 rpm for 20 minutes in a desk centrifuge and subsequently resuspended in fresh YEB medium without antibiotics under sterile conditions. The cell suspension was used for the transformation.

The wild-type plants from sterile culture were obtained by vegetative replication. For this, only the tip of the plant was cut off and transferred to a fresh 2MS medium in a sterile preserving jar. The hair on the upper side of the leaves and the center ribs of the leaves were removed from the rest of the plant. The leaves were cut into pieces of approximately 1 cm<sup>2</sup> with a razor-blade. The agrobacterial culture was transferred to a small petri dish (2 cm diameter). The leaf pieces were briefly pulled through this solution and were placed with the lower sides of the leaves on 2MS medium in petri dishes (9 cm diameter) in such a way that they touched the medium. After two days in the dark at 25 °C, the explants were transferred to plates with callus induction medium and brought to a temperature of 28 °C in the climate chamber. The medium had to be changed every 7 to 10 days. As soon as calli were formed, the explants were transferred to shoot induction medium with Claforan (0.6 % BiTec-Agar (g/v), 2.0 mg/l zeatinribose, 0.02 mg/l naphthyl acetic acid, 0.02 mg/l gibberellic acid, 0.25 g/ml Claforan, 1.6 % glucose (g/v) and 50 mg/l kanamycin) in sterile preserving jars. After approximately one month, organogenesis occurred and the shoots that had developed could be cut off. The cultivation of the shoots was carried out on 2MS medium with Claforan and selection marker. As soon as a strong root ball had developed, it was possible to pot the plants in pricking-out soil.

#### Example 7 – Characterization of the transgenic plants from example 4, 5 and 6

The tocopherol and tocotrienol content in leaves and seeds of the plants (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum*) transformed with the constructs described above were analyzed. For this purpose, the transgenic plants were cultivated in the greenhouse and plants expressing the gene encoding for the chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *E. coli* K12 were analyzed on Northern and Western level. The tocopherol content and tocotrienol content in the leaves and seeds of these plants was determined by means of HPLC. In all cases, the tocopherol and/or tocotrienol content in transgenic plants additionally expressing a *tyrA* gene was increased in relation to non-transformed plants.

Tables 1A (young leaves) and 1B (senescing leaves) indicate the contents [μg/gFG] of α-tocopherol, γ-tocopherol, α-tocotrienol and total vitamin E in leaves of different ages in *Nicotiana tabacum*, cv. SNN wild type (stated values MW +/-SD, n = 9) and plants that overexpress the *tyrA* gene from *E. coli*.

Table A: young leaves

	$\alpha$ -tocopherol		$\gamma$ -tocopherol		$\alpha$ -tocotrienol	total vitamin E	
Wild type SNN	19.0	$\pm 2.9$	0.31	$\pm 0.03$	<0.20	19.3	$\pm 2.8$
Line 8	27.6		1.15		1.03	30.0	
Line 15	35.7		0.73		1.00	37.4	
Line 54	32.3		4.60		1.60	38.7	
Line 86	15.7		4.47		0.98	21.4	
Line 113	32.3		0.71		0.62	33.6	

Table B: senescing leaves

	$\alpha$ -tocopherol		$\gamma$ -tocopherol		$\alpha$ -tocotrienol	total vitamin E	
Wild type SNN	32.9	$\pm 2.1$	0.31	$\pm 0.05$	<0.20	33.1	$\pm 2.1$
Line 8	50.7		0.69		2.69	54.2	
Line 15	54.7		0.69		0.81	56.2	
Line 54	37.0		2.60		0.35	40.0	
Line 86	36.5		1.51		0.43	38.4	
Line 113	46.2		0.45		2.29	48.9	

Example 8 – Cloning of a subfragment of the gene encoding for the plastidically expressed chorismate mutase-1 from *Arabidopsis thaliana*

The DNA sequence encoding for the transit peptide of the chorismate mutase-1 gene was amplified by means of polymerase chain reaction (PCR) from *Arabidopsis thaliana*, using a sense-specific primer (CM-1TP 5' SEQ ID NO. 11) and an antisense-specific primer (CM-1TP 3' SEQ ID NO. 12):

The PCR conditions were the following:

The PCR occurred in a 50  $\mu$ l reaction approach which included:

- 2  $\mu$ l of an *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0.2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1.5 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>
- 5  $\mu$ g bovine serum albumine
- 40 pmol CM-1TP 5' primer
- 40 pmol CM-1TP 3' primer
- 15  $\mu$ l 3.3  $\mu$  rTth DNA polymerase XLbuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 U rTth DNA polymerase XL (PE Applied Biosystems)

The PCR was performed under the following cycle conditions:

Step 1: 5 minutes 94° C (denaturation)  
Step 2: 3 seconds 94° C  
Step 3: 1 minute 55 °C (annealing)  
Step 4: 2 minutes 72 °C (elongation)  
30 repetitions of steps 2 to 4  
Step 5: 10 minutes 72 °C (post-elongation)  
Step 6: 4 °C (waiting cycle)

The amplicon was cloned into the PCR cloning vector pCR-Script (Stratagene) by using standard methods. The identity of the generated amplicon was confirmed by sequencing using a vector-specific primer.

Example 9 – Cloning of the gene encoding for the cytosolically expressed chorismate mutase-2 from *Arabidopsis thaliana*

The DNA encoding for the chorismate mutase-2 gene was amplified by means of polymerase chain reaction (PCR) from *Arabidopsis thaliana*, using a sense-specific primer (CM-2 5' SEQ ID NO. 13) and an antisense-specific primer (CM-2 3' SEQ ID NO. 14).

The PCR conditions were the following:

The PCR occurred in a 50 µl reaction approach which included:

- 2 µl of an *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0.2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1.5 mM Mg (OAc)<sub>2</sub>
- 5 µg bovine serum albumine
- 40 pmol CM-2 5' primer
- 40 pmol CM-2 3' primer
- 15 µl 3.3 µ rTth DNA polymerase XLbuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 U rTth DNA polymerase XL (PE Applied Biosystems)



The PCR was performed under the following cycle conditions:

Step 1: 5 minutes 94° C (denaturation)  
 Step 2: 3 seconds 94° C  
 Step 3: 1 minute 55 °C (annealing)  
 Step 4: 2 minutes 72 °C (elongation)  
 30 repetitions of steps 2 to 4  
 Step 5: 10 minutes 72 °C (post-elongation)  
 Step 6: 4 °C (waiting cycle)

The amplicon was cloned into the PCR cloning vector pGEM-T (Promega) by using standard methods. The identity of the generated amplicon was confirmed by sequencing using the M13F (-40) primer.

Example 10 – Creation of the chimeric gene construct CM-1-TP-CM-2, consisting of the DNA sequence encoding for the transit peptide (TP) of the chorismate mutase-1 (CM-1) and of the DNA sequence encoding for the chorismate mutase-2 (CM-2)

In order to create the chimeric gene CM-1-TP-CM-2, the plasmid pCR-Script/CM-1-TP was digested with the restriction enzymes NcoI/SalI.

The DNA fragment of the CM-2 isolated from the plasmid pGEM-Teasy/CM-2 by means of the restriction enzymes NcoI/SalI was ligated into this plasmid. The translation of this chimeric DNA construct (SEQ ID NO. 5) (pCR-Script/AtCM-1TP-AtCM-2, figure 4) results in the formation of a fusion protein<sup>1</sup> by combining the transit peptide of the CM-1 with the CM-2 (SEQ ID NO.6).

Example 11 – Production of plant expression cassettes containing the chimeric gene CM-1-TP-CM-2

Transgenic plants were created that express the chimeric gene CM-1-TP-CM2 from *A. thaliana*, on the one hand under the control of the constitutive 35S promoter of the CaMV (cauliflower mosaic virus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980), and under the control of the seed-specific promoter of the legumin gene from *Vicia faba* (Kafatos et al., Nuc. Acid Res., 14 (6): 2707-2720, 1986) on the other hand. The basis for the constitutive expression of the chimeric gene CM-1TP-CM-2 was the vector pBinAR (Höfgen and Willmitzer, Plant Sci. 66: 221-230, 1990). This vector contains the 35S promoter of the

---

<sup>1</sup> Translators note: This appear to be an error in the German: If "indem" is correctly written as one word, it means "by," in which case the verb form must be "kombiniert wird" (not "kombiniert ist," as written). In that case, the correct translation is "formation of a fusion protein by combining the transit peptide of the CM-1 with the CM-2...", as it appears here. If, however, this is a spelling error and "in dem" (two words, meaning "in which") was intended, the correct translation would be "formation of a fusion protein in which the transit peptide of the CM-1 is combined with the CM-2..."



CaMV (cauliflower mosaic virus) (Franck et al., 1980) and the termination signal of the octopine synthase gene (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-

846, 1984). For making this plasmid, the chimeric gene CM-1-TP-CM2 was isolated from the plasmid pCR-Script/AtCM-1TP-AtCM-2 (figure 4) by using the flanking restriction interfaces KpnI/SalI. Using standard methods, this fragment was ligated into a KpnI/SalI sliced pBinAR. The resulting plasmid (pBinAR/CM-1TP/CM-2, figure 5) was used for the creation of transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*.

In order to create a plasmid that enables the seed-specific expression of the chimeric gene CM-1TP/CM-2 in plants, the seed-specific promoter of the legumin B4 gene (Kafatos et al., Nuc. Acid Res., 14 (6): 2707-2720, 1986) was used. The 2,7 Kb fragment of the legumin B4 gene promoter was isolated from the plasmid pGEMTeasy/lePNOS, using the EcoRI interface flanking the promoter 5' and the KpnI interface flanking 3'. The plasmid pBinAR/CM-1TP/CM-2 was also treated with the restriction enzymes EcoRI and KpnI. This resulted in the 35S promoter of the CaMV being separated from this plasmid, see figure 5). Subsequently, the promoter of the legumin gene was cloned as EcoRI/KpnI fragment into this vector, creating a plasmid which put the expression of the chimeric gene CM-1TP-CM-2 under the control of this seed-specific promoter, see figure 6). This plasmid (pBinLeP/CM-1TP/CM-2) was used for the creation of transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants.

**Example 12 – Production of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing the chimeric gene CM-1-TP-CM-2**

The production of the plants occurred analogous to example 4, using the plasmids (pBinAR/AtCM-1TP/CM-2) and (pBinLeP/CM-1TP/CM-2).

**Example 13 – Production of transgenic *Brassica napus* plants expressing the tyrA gene**

The production of the plants occurred analogous to example 5, using the plasmids (pBinAR/AtCM-1TP/CM-2) and (pBinLeP/CM-1TP/CM-2).

Example 14 – Production of transgenic *Nicotiana tabacum* plants expressing the tyrA gene

The production of the plants occurred analogous to example 6, using the plasmids (pBinAR/AtCM-1TP/CM-2) and (pBinARleP/CM-1TP/CM-2).

Example 15 – Characterization of the transgenic plants from example 12, 13 and 14

The tocopherol and tocotrienol content in leaves and seeds of the plants (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum*) transformed with the constructs described above were analyzed. For this, the transgenic plants were cultivated in the greenhouse and plants expressing the gene encoding for the cytosolic chorismate mutase were analyzed on Northern and Western level. The tocopherol content and tocotrienol content in the leaves and seeds of these plants was determined by means of HPLC. In all cases, the tocopherol and/or tocotrienol content in transgenic plants additionally expressing chorismate mutase genes was increased in comparison to non-transformed plants.

## Patent Claims

1. A method for the production of fine chemicals by cultivating organisms which exhibit a genetically modified shikimate pathway in comparison with the wild type.
2. The method according to claim 1, characterized in that at least one measure selected from the group of measures A and B is performed for the genetic modification of the shikimate pathway, with A and B having the following meaning:  
  
A: Increase of the activity of at least one enzyme of the shikimate pathway of the wild type;  
  
B: Insertion into the organism of at least one gene that bridges the metabolic pathway of the shikimate pathway of the wild type, and for which the wild type does not have an orthologous gene.
3. The method according to claim 2, characterized in that in measure A the activity of at least one enzyme of the shikimate pathway is increased by means of overexpression of nucleic acids which encode proteins with this enzymatic activity.
4. The method according to claim 3, characterized in that a nucleic acid encoding a chorismate mutase is inserted into the organism.
5. The method according to claim 4, characterized in that a nucleic acid encoding a chorismate mutase is inserted into the organism whose activity is subject to a reduced post-translational regulation in the organism.
6. The method according to claim 5, characterized in that a nucleic acid encoding a chorismate mutase is inserted into the organism which is subject to a reduced post-translational regulation in the localization of the expression in the organism.
7. The method according to one of the claims 1 through 6, characterized in that a plant is used as the organism.
8. The method according to claim 7, characterized in that a cytosolic chorismate mutase is inserted into plastids of a plant.

9. The method according to claim 8, characterized in that a nucleic acid construct is inserted into the plant, containing a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide and a nucleic acid encoding a protein, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 4 or a sequence derived from this sequence by means of substitution, insertion or deletion of amino acids which exhibits a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 4 and the enzymatic properties of a chorismate mutase.
10. The method according to claim 9, characterized in that a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide is used as nucleic acid which encodes the plastidic transit peptide of a plastidic chorismate mutase.
11. The method according to claim 10, characterized in that a nucleic acid construct of the nucleic acid sequence SEQ ID NO. 5 is inserted into plants.
12. A nucleic acid construct containing a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide and a nucleic acid encoding a protein, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 4 or a sequence derived from this sequence by means of substitution, insertion or deletion of amino acids which exhibits a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 4 and the enzymatic property[ies?] of a chorismate mutase.
13. The nucleic acid construct according to claim 12, characterized in a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide is used as nucleic acid which encodes the plastidic transit peptide of a plastidic chorismate mutase.
14. The nucleic acid construct according to claim 13, characterized in that it exhibits the nucleic acid sequence SEQ ID NO. 5.
15. The method according to one of the claims 2 through 11, characterized in that a plant is used as organism and that in measure B a nucleic acid encoding a prephenate dehydrogenase is inserted into a plant as a gene for which the wild type does not have an orthologous gene.

16. The method according to one of the claims 1 through 11 and 15, characterized in that a nucleic acid encoding a prephenate dehydrogenase in combination with a nucleic acid encoding a chorismate mutase is inserted into a plant.
17. The method according to claim 16, characterized in that a nucleic acid encoding a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase is inserted into a plant.
18. The method according to claim 17, characterized in that a nucleic acid is inserted which encodes a protein, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 or a sequence derived from this sequence by means of substitution, insertion or deletion of amino acids which exhibits a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 2 and the enzymatic property[ies?] of a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase.
19. The method according to claim 18, characterized in that a nucleic acid of bacterial origin is used.
20. The method according to claim 18 or 19, characterized in that a nucleic acid is used which contains the sequence described in SEQ ID NO. 1.
21. The nucleic acid construct containing a nucleic acid according to one of the claims 3 through 6, 8 and 15 through 17, which are functionally linked with one or more regulation signals that ensure the transcription and translation in plants.
22. The nucleic acid construct according to claim 21, additionally containing a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide.
23. The nucleic acid construct according to claim 22, containing a nucleic acid construct pursuant to claim 12.
24. The nucleic acid construct according to claim 22, containing a nucleic acid encoding a plastidic transit peptide and a nucleic acid encoding a protein, containing the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 or a sequence derived from this sequence by means of substitution, insertion or deletion of amino acids which exhibits a homology of at least 30 % on the amino acid level with the sequence SEQ ID NO. 2 and the enzymatic property[ies?] of a chorismate mutase-prephenate dehydrogenase.



25. The use of a nucleic acid pursuant to one of the claims 3 through 6, 8 and 15 through 17, and of the nucleic acid constructs pursuant to one of the claims 12 through 14 and 21 through 24 for the production of transgenic plants.
26. The use according to claim 25, characterized in that the transgenic plant exhibits a higher content of fine chemicals in comparison with the wild type.
27. The use according to claim 25, characterized in that the transgenic plant exhibits a higher resistance towards abiotic stress in comparison with the wild type.
28. A genetically modified organism where the genetic modification changes the metabolite flow of the shikimate pathway in comparison with the wild type and where the organism exhibits a modified content of fine chemicals in comparison with the wild type.
29. The genetically modified organism according to claim 28, where the genetic modification  
  
increases the gene expression of a nucleic acid encoding a chorismate mutase, prephenate dehydrogenase or chorismate mutase-prephenate dehydrogenase in comparison with the wild type in the event that the parental organism contains the corresponding nucleic acid, or  
  
causes [such expression] in the event that the parental organism does not contain the corresponding nucleic acid.
30. The genetically modified organism according to claim 29, transformed with a nucleic acid construct pursuant to one of the claims 21 through 24.
31. The genetically modified organism according to claim 29, containing a nucleic acid construct pursuant to one of the claims 21 through 24.
32. The genetically modified organism according to one of the claims 28 through 31, characterized by the fact that a plant is used as the organism.
33. The method for the production of genetically modified organisms pursuant to one of the claims 28 through 32, characterized in that at least one nucleic acid pursuant to one of the claims 3 through 6, 8 and 15 through 17, or at least one nucleic acid construct pursuant to one of the claims 12 through 14 and 21 through 24 is inserted into the genome of the parental organism.

34. The use of the genetically modified organisms according to one of the claims 28 through 32 for the production of fine chemicals.
35. The use of the genetically modified organisms according to one of the claims 28 through 32 as feed and foodstuffs or for the production of processed foodstuffs.
36. Use of a nucleic acid pursuant to one of the claims 3 through 6, 8 and 15 through 17, and of the nucleic acid constructs pursuant to one of the claims 12 through 14 and 21 through 24 in order to increase the content of fine chemicals in organisms.
37. Use of a nucleic acid pursuant to one of the claims 3 through 6, 8 and 15 through 17, and of the nucleic acid constructs pursuant to one of the claims 12 through 14 and 21 through 24 for the production of fine chemicals in organisms.

ADOBE .pdf pages 50-54 omitted

ADOBE .pdf page 55:

### SEQUENCE PROTOCOL

<120> Changing the fine chemicals content in organisms by genetically modifying the shikimate pathway

[Sequences omitted]

ADOBE .pdf page 62:

<223> The description of artificial sequence: chimeric nucleic acid; transit peptide of the plastidic chorismate mutase + encoding sequence of the cytosolic chorismate mutase

ADOBE .pdf page 66:

<223> The description of artificial sequence: primer

ADOBE .pdf pages 72-74 is the German version of the International Search Report, which is included on pages 69-71 in English.

## DECLARATION

I, Thomas Herb, technical translator for German-American Business Translation, do hereby declare that I am conversant with the English and German languages and am a competent translator thereof. I declare further that to the best of my knowledge and belief the following translation of International Publication Number WO 02/00901 A is a true and correct translation made by me of the document in the German language attached hereto.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Signed this 16<sup>th</sup> day of January, 2003.

Thomas Herb

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

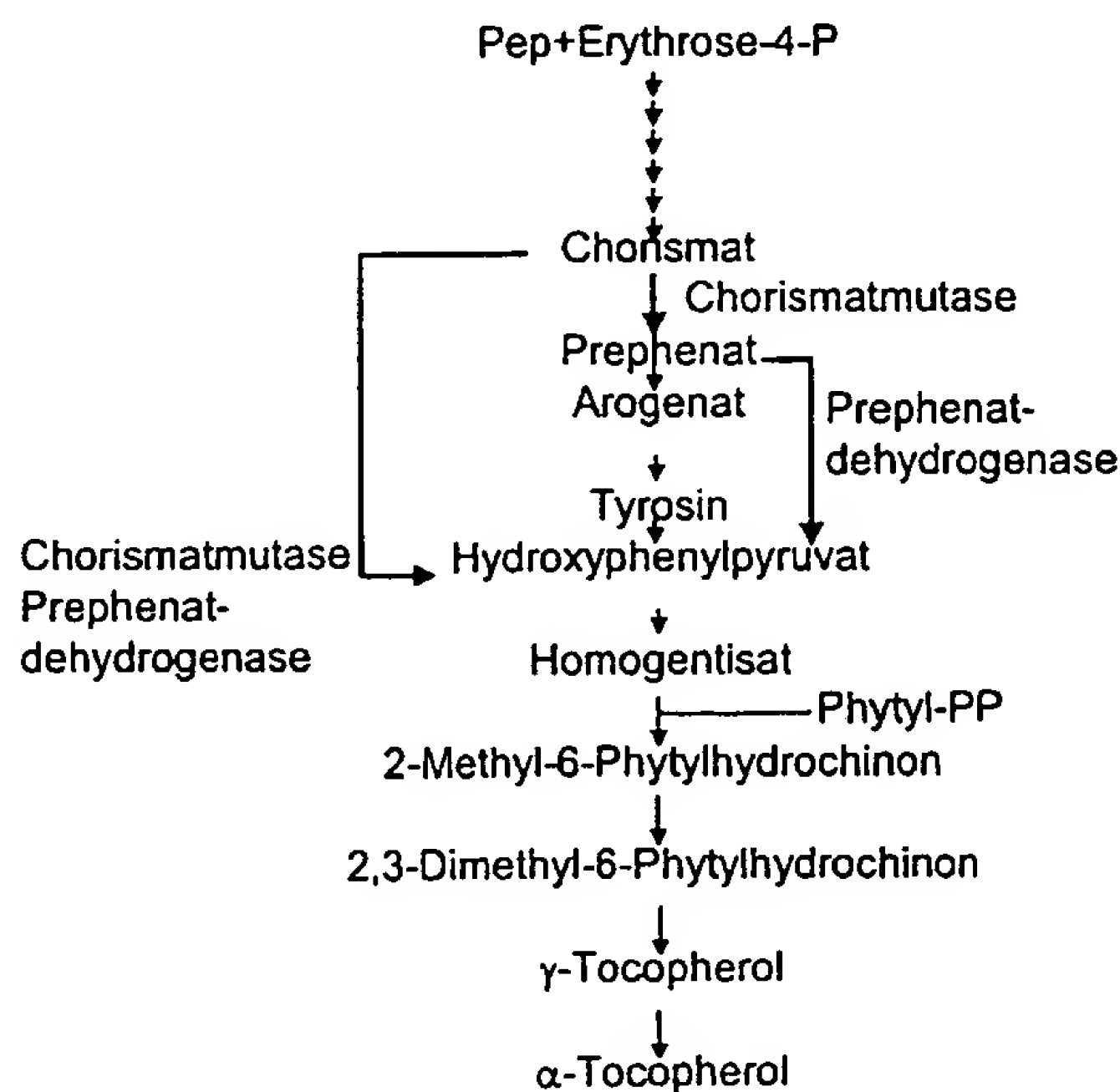
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/00901 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, 15/62, 9/02, 9/90, A01H 5/00
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07391
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BADUR, Ralf [DE/DE]; Von Eckenbrecher Weg 2, 38642 Goslar (DE). GEIGER, Michael [DE/DE]; Neuer Weg 15, 06484 Quedlinburg (DE). KUNZE, Irene [DE/DE]; Mühlenweg 11, 06466 Gatersleben (DE). SOMMER, Susanne [DE/DE]; Am Kreishaus 12a, 65719 Hofheim (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juni 2001 (28.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (74) Anwalt: BIEBERBACH, Andreas; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).
- (30) Angaben zur Priorität:
- |              |                                |    |
|--------------|--------------------------------|----|
| 100 30 647.0 | 29. Juni 2000 (29.06.2000)     | DE |
| 100 64 454.6 | 21. Dezember 2000 (21.12.2000) | DE |
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CHANGING THE FINE CHEMICAL CONTENT IN ORGANISMS BY GENETICALLY MODIFYING THE SHIKIMATE PATHWAY

(54) Bezeichnung: VERÄNDERUNG DES GEHALTS AN FEINCHEMIKALIEN IN ORGANISMEN DURCH GENETISCHE VERÄNDERUNG DES SHIKIMATWEGES



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing fine chemicals, especially vitamine E, vitamine K and/or ubiquinone, by cultivating organisms, especially plants, exhibiting a genetically modified shikimate pathway in relation to the wild type. The invention also relates to the transgenic organisms themselves.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/00901 A1





CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere Vitamin E, Vitamin K und/oder Ubichinon durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp einen genetisch veränderten Shikimatweg aufweisen, sowie die transgenen Organismen selbst.

Veränderung des Gehalts an Feinchemikalien in Organismen durch genetische Veränderung des Shikimatweges

## 5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere Vitamin E, Vitamin K und/oder Ubichinon durch Kultivierung von Organismen, insbesondere

10 Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp einen genetisch veränderten Shikimatweg aufweisen, sowie die transgenen Organismen selbst.

Organismen, insbesondere Pflanzen, weisen eine Reihe von Stoffwechselprodukten auf, die als Feinchemikalien einen hohen wirt-

15 schaftlichen Wert haben. Als Feinchemikalien sind beispielsweise aromatische Aminosäuren, Salicylsäurederivate, Phenylpropanoide, Flavonoide, Stilbene, Xanthone und Chinone, insbesondere die gemischten Prenyllipid-Verbindungen mit Vitamin E oder Vitamin K Aktivität zu nennen.

20

In biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien werden Organismen, die in der Lage sind diese Feinchemikalien herzustellen, kultiviert und die gewünschten Feinchemikalien aus den Organismen isoliert.

25

Für wirtschaftliche Verfahren zur biotechnologischen Herstellung von Feinchemikalien, aber auch für die Verwendung der Organismen als prozessierte oder nicht prozessierte Lebens- oder Futtermittel, ist es wünschenswert, den Gehalt an Feinchemikalien

30 in den Organismen gezielt zu verändern, wie beispielsweise den Gehalt der gewünschten Feinchemikalie zu erhöhen und/oder den Metabolitfluß zu nicht gewünschten Feinchemikalien zu hemmen.

Wirtschaftlich bedeutende Feinchemikalien sind beispielsweise

35 Plastochinone, Ubichinone sowie Verbindungen mit Vitamin E- oder Vitamin K-Aktivität, die eine Isoprenoid-Seitenkette aufweisen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

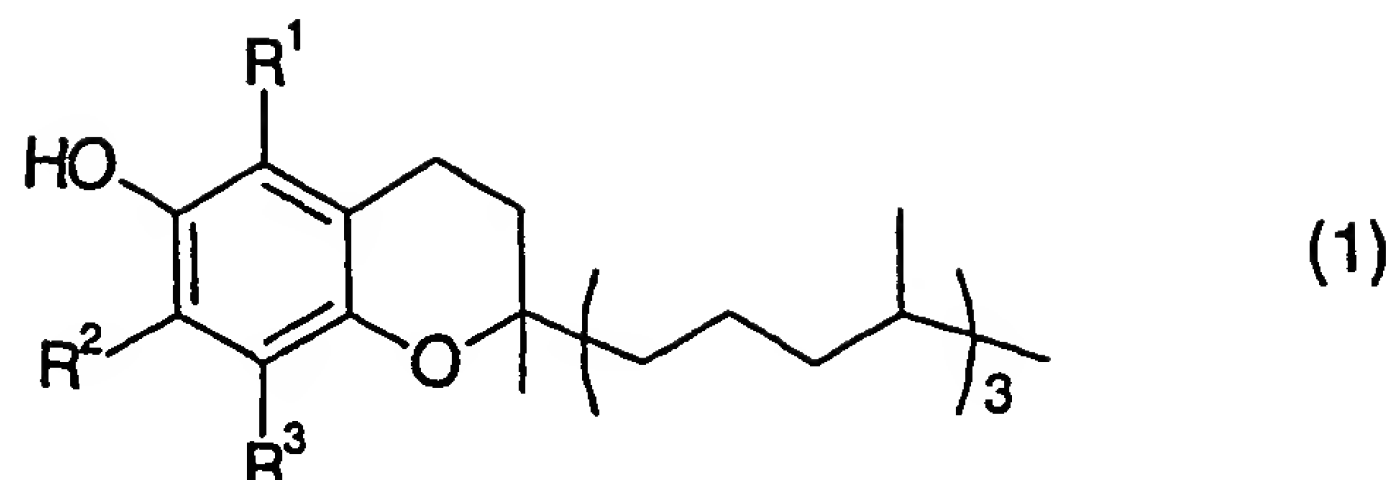
Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-

40 Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die Gruppe der Tocopherole (1a-d) weist eine gesättigte Seitenkette auf, die Gruppe der Tocotrienole (2a-d) eine ungesättigte Seitenkette:

45

2

5



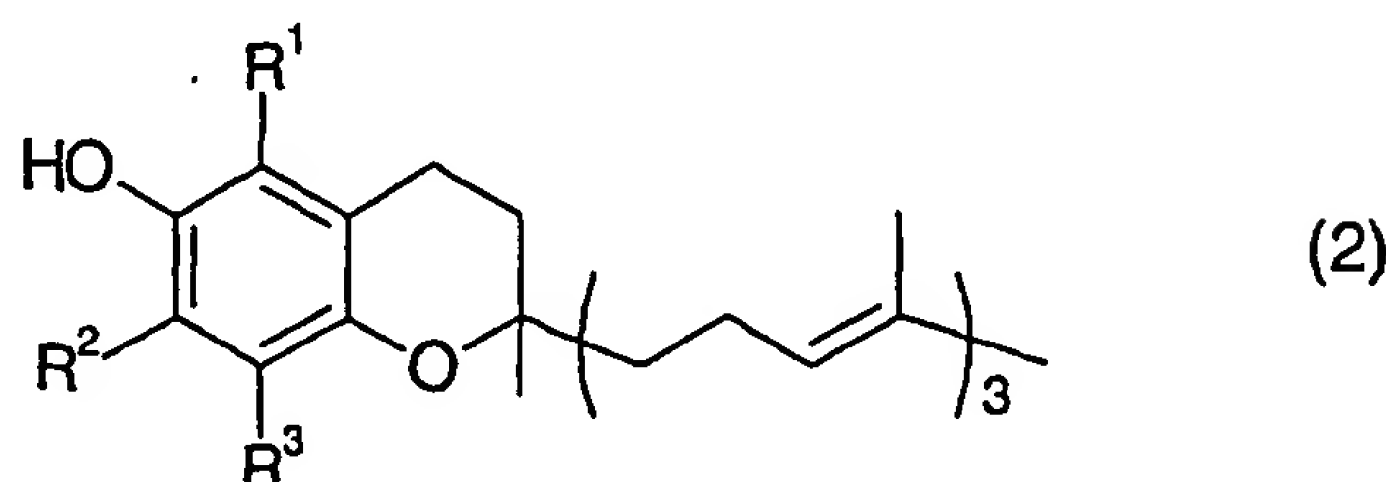
1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

10 1b,  $\beta$ -Tocopherol:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$

1c,  $\gamma$ -Tocopherol:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d,  $\delta$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

15



20

2a,  $\alpha$ -Tocotrienol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2b,  $\beta$ -Tocotrienol:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$

2c,  $\gamma$ -Tocotrienol:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

2d,  $\delta$ -Tocotrienol:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

25

In der vorliegenden Erfindung werden unter Vitamin E alle vorstehend erwähnten Tocopherole und Tocotrienole mit Vitamin-E-Aktivität verstanden.

30 Diese Verbindungen mit Vitamin-E-Aktivität sind wichtige natürliche fett-lösliche Antioxidantien. Ein Mangel an Vitamin E führt bei Menschen und Tieren zu pathophysiologischen Situationen. Vitamin E-Verbindungen haben daher einen hohen wirtschaftlichen Wert als Zusatzstoffe im Food- und Feed-Bereich, in pharmazeutischen Formulierungen und in kosmetischen Anwendungen.

Die in der Natur vorkommenden Verbindungen mit Vitamin K-Aktivität sind Derivate des 1,4-Naphthochinons (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 5., 488-506, Vitamin K).

40 Phyllochinon (frühere Bezeichnung: Vitamin K<sub>1</sub>) weist eine größtenteils gesättigte Seitenkette auf, während die Gruppe der Menaquinone-n (frühere Bezeichnung: Vitamin K<sub>2</sub>) eine ungesättigte Seitenkette mit 4 bis 13 Isoprenylresten aufweist.

45

## 3

In der vorliegenden Erfindung werden unter Vitamin K alle Verbindungen mit Vitamin K-Aktivität verstanden, insbesondere die vorstehend erwähnten Verbindungen.

- 5 Ausgangspunkt der Biosynthese der Isoprenoidseitenkette ist Isopentenylpyrophosphat (IPP). IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C10) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP  
10 Einheiten führt zum Sesquiterpen (C15) Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C20) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP).

- Phyllochinon enthält eine C20 Phytyl-Kette, in der nur die erste Isopren-Einheit eine Doppelbindung enthält. GGPP wird durch die  
15 Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase (GGPPOR) zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

- Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur  
20 Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Chinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen.

- Chorismat wird ausgehend von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) durch deren Kondensation zu 3-deoxy-D-  
25 Arabino-heptulosonat-7-Phosphat (DAHP) über die Zwischenstufen 3'-Dehydroquinat, 3'-Dehydroshikimat, Shikimat, Shikimat-3-Phosphat und 5'-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat gebildet. Dabei wird das Erythrose-4-Phosphat vom Calvinzyklus gebildet und das PEP von der Glykolyse bereitgestellt.

- 30 In höheren Pflanzen wird Tyrosin ausgehend von Chorismat über Prephenat und Arogenat gebildet. Die aromatische Aminosäure Tyrosin wird in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird.

- 35 Die Homogentisinsäure wird anschließend an Phytylpyrophosphat (PPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat gebunden, um die Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol, das 2-Methyl-6-phytylhydrochinon bzw. das 2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinon zu bilden.  
40 Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\gamma$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol.

- 45 Es ist bekannt, durch Überexpression bzw. Herunterregulation von Biosynthesegenen des Tocopherolbiosyntheseweges, unter dem in der vorliegenden Erfindung der Biosyntheseweg von Hydroxyphenyl-

## 4

pyruvat bis Tocopherol verstanden wird, den Gehalt an Vitamin E in Pflanzen zu modifizieren.

WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

WO 99/04622 bzw. D. DellaPenna et al., Science 1998, 282, 2098-2100 beschreiben Gensequenzen codierend für eine  $\gamma$ -Tocopherolmethyltransferase aus Synechocystis PCC6803 und Arabidopsis thaliana und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

Ferner ist bekannt, durch Überexpression bzw. Herunterregulation von Biosynthesegenen des Biosyntheseweges der Isoprenoid-Seitenkette, den Gehalt an Vitamin E in Pflanzen zu modifizieren.

WO 99/23231 zeigt, daß die Expression einer Geranylgeranyl-Reductase in transgenen Pflanzen eine gesteigerte Tocopherolbiosynthese zur Folge hat.

WO 00/08169 beschreibt Gensequenzen codierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

Alle diese Methoden liefern zwar Organismen, insbesondere Pflanzen, die einen modifizierten Gehalt an der Feinchemikalie Vitamin E aufweisen, dennoch ist oft die Höhe des Gehalts an Vitamin E für Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Isolierung aus diesen transgenen Organismen noch nicht zufriedenstellend.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien durch Kultivieren von Organismen, bzw. transgene Organismen die Feinchemikalien herstellen können, mit optimierten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen, die die geschilderten Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

40

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien gefunden, indem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp einen genetisch veränderten Shikimatweg aufweisen.

Unter Shikimatweg wird in der vorliegenden Erfindung, insbesondere für höhere Pflanzen der vorstehend beschriebene Biosyntheseweg ausgehend von D-Erythrose-4-Phosphat über Shikimat,

## 5

Chorismat, Prephenat, Arogenat, Tyrosin bis einschließlich zu 4-Hydroxyphenylpyruvat verstanden (G. Michal, Biochemical Pathways, Biochemie-Atlas, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 1999, Seite 59 bis 60, Abb. 4.7-1 und 5 Kapitel 4.7.1)

Vorzugsweise wird in der vorliegenden Erfindung unter Shikimatweg der Stoffwechselweg von Shikimat bis 4-Hydroxyphenylpyruvat, besonders bevorzugt der Stoffwechselweg von Chorismat bis 10 4-Hydroxyphenylpyruvat verstanden, wobei für Pflanzen der Stoffwechselweg ab Chorismat über Prephenat, Arogenat und Tyrosin verläuft.

Unter Feinchemikalien werden Stoffwechselprodukte des Organismus 15 verstanden, die aus dem Shikimatweg resultieren. Der Shikimatweg beginnt dabei bei D-Erythrose-4-Phosphat und endet bei 4-Hydroxyphenylpyruvat, wie vorstehend beschrieben. Für diese Stoffwechselprodukte stellen die Ausgangsverbindung D-Erythrose-4-Phosphat, die Endverbindung 4-Hydroxyphenylpyruvat sowie alle, 20 vorstehend erwähnten, Zwischenstufen des Shikimatweges, die Ausgangsverbindungen, nachstehend auch Zwischenverbindungen bezeichnet, dar, die biosynthetisch vom Organismus in die Stoffwechselprodukte umgewandelt werden.

25 Bevorzugte Feinchemikalien sind die aromatischen Aminosäuren, wie beispielsweise Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, Salicylsäurederivate, Folsäurederivate, Phenylpropanoide, wie beispielsweise Lignin, Lignane oder Coumarine, insbesondere Scopoletin oder Scopolin, Flavonoide, wie beispielsweise Chalcone, Flava- 30 none, Flavonole, Anthocyanidine oder Isoflavonoide, Stilbene, Xanthone, oder Chinonderivate, wie beispielsweise Vitamin E, Vitamin K, Ubichinone, Plastochinone oder Shikonin.

Besonders bevorzugte Feinchemikalien sind Vitamin E, Vitamin K 35 oder Ubichinon, insbesondere Vitamin E.

Je nachdem ob die genetische Veränderung des Shikimatweges zu einer Erhöhung oder Erniedrigung des Metabolitflusses zu einer bestimmten Zwischenverbindung - die Teil des Shikimatweges ist - 40 führt, erhöht sich bzw. erniedrigt sich der Gehalt der Feinchemikalie die biosynthetisch im Organismus aus dieser Zwischenverbindung hergestellt wird. Unter genetischer Veränderung des Shikimatweges wird somit vorzugsweise die Erhöhung oder Erniedrigung des Metabolitflusses zu einer Zwischenverbindung 45 des Shikimatweges verstanden.



## 6

Genetische Veränderung des Shikimatweges die zu einer Erhöhung des Metabolitflusses zu einer Zwischenverbindung und damit der entsprechenden Feinchemikalie führen, sind beispielsweise die folgenden Maßnahmen A, B oder C:

5

A: Erhöhung der Aktivität mindestens eines Enzyms des Shikimatweges des Wildtyps,

10

beispielsweise durch Überexpression von Genen des Shikimatweges, die Proteine mit dieser enzymatischen Aktivität codieren, durch das Ausschalten von negativen Regulationsmechanismen von zur Zwischenverbindung führenden Stoffwechselwegen, wie beispielsweise das Ausschalten der Feedback-Inhibierung oder das Einbringen von orthologen Genen die im gewünschten Organismus keiner Regulation unterliegen.

15

B: Einbringen mindestens eines Gens in den Organismus zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist und das den Stoffwechselweg des Shikimatweges des Wildtyps überbrückt. Dieses Gen kann beispielsweise durch die neue Genfunktion eine Erhöhung des Stoffflusses zu der Zwischenverbindung bewirken, bei der die Überbrückung endet.

20

C: Inaktivierung von Genen die Enzyme kodieren, die mit den Enzymen des Stoffwechselwegs, der zum gewünschten Produkt führt, konkurrieren.

25

Genetische Veränderung des Shikimatweges die zu einer Erniedrigung des Metabolitflusses zu einer Zwischenverbindung und damit der entsprechenden Feinchemikalie führen, sind beispielsweise die folgenden Maßnahmen D, E oder F.

30

D: Überexpression eines Stoffwechselgens und damit die Erhöhung der entsprechenden Enzymaktivität, die von dieser Zwischenverbindung wegführt;

35

E: Inaktivierung von Genen die Enzyme kodieren, die zu dieser Zwischenverbindung führen, beispielsweise durch Antisense-Technik oder Kosuppression;

40

F: Expression eines Gens zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist. Dieses Gen kann beispielsweise den Stoffwechselweg des Shikimatweges des Wildtyps überbrücken und durch die neue Genfunktion eine Erniedrigung des Stoffflusses zu den überbrückten Zwischenverbindungen bewirken.

45

## 7

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt die genetische Veränderung des Shikimatweges im Organismus zu einer Erhöhung des Metabolitflusses zu einer gewünschten Zwischenverbindung und damit der entsprechenden  
5 gewünschten Feinchemikalie.

Bevorzugt erfolgt die Erhöhung des Metabolitflusses zu einer gewünschten Zwischenverbindung des Shikimatweges und damit zur gewünschten Feinchemikalie durch mindestens eine Maßnahme aus-  
10 gewählt aus der Gruppe der Maßnahme A und B, also durch die Maßnahme A und/oder B, wobei die Maßnahmen A und B die vorstehend beschriebene Bedeutung haben.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens  
15 ist daher dadurch gekennzeichnet, daß man zur genetischen Veränderung des Shikimatweges mindestens eine Maßnahme ausgewählt aus der Gruppe der Maßnahmen A und B durchführt, wobei A und B folgende Bedeutung haben:

20 A: Erhöhung der Aktivität mindestens eines Enzyms des Shikimatweges des Wildtyps;

B: Einbringen mindestens eines Gens in den Organismus zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist und das den  
25 Stoffwechselweg des Shikimatweges des Wildtyps überbrückt.

Die Erhöhung der Aktivität mindestens eines Enzyms des Shikimatweges des Wildtyps nach Maßnahme A kann beispielsweise durch Überexpression von Nukleinsäuren, also Genen des Shikimatweges,  
30 die Proteine mit dieser enzymatischen Aktivität codieren, durch das Ausschalten von negativen Regulationsmechanismen von zur Zwischenverbindung führenden Stoffwechselwegen, wie beispielsweise das Ausschalten der Feed-back-Inhibierung oder das Einbringen von orthologen Genen erfolgen, die im gewünschten  
35 Organismus keiner Regulation unterliegen.

Vorzugsweise erfolgt die Erhöhung der Aktivität mindestens eines Enzyms des Shikimatweges des Wildtyps gemäß Maßnahme A durch Überexpression von Nukleinsäuren des Shikimatweges, die Proteine  
40 mit dieser enzymatischen Aktivität codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Durchführung der Maßnahme A dadurch, daß man eine Nukleinsäure, codierend eine Chorismatmutase, in den Organismus einbringt.  
45

## 8

Unter einer Chorismatmutase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Chorismat in Prephenat umzuwandeln.

- 5 Prinzipiell sind alle Chorismatmutasen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar, wie beispielsweise die Chorismatmutase aus *Petroselinum Crispum* (Accessionsnummer: T14902, T14901), Chorismatmutase aus *Streptomyces coelicolor* (T36865), Chorismatmutase aus *Bacillus subtilis* (A33894), Chorismatmutase aus *Asper-*  
10 *gillus nidulans* (AAD30065) oder die nachstehend beschriebenen Chorismatmutasen aus *Arabidopsis thaliana* oder die nachstehend beschriebene Chorismatmutase Aktivität der Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase (tyrA) aus *E. coli*.
- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform werden Chorismatmutasegene verwendet, die eine Chorismatmutase kodieren, deren Aktivität einer reduzierten posttranslationalen Regulation im Organismus unterliegt. Unter einer reduzierten Regulation wird eine Regulation der Aktivität von höchstens 99 %, vorzugsweise  
20 höchstens 70 %, besonders bevorzugt 50 %, insbesondere bevorzugt 0 %, also keine Regulation der Aktivität, verglichen mit der Wildtypregulation verstanden.

- Chorismatmutasegene, die eine Chorismatmutase kodieren, deren  
25 Aktivität im Organismus einer reduzierten, insbesondere keiner Regulation unterliegt, sind beispielsweise Chorismatmutasegene aus gattungsverschiedenen Organismen oder Chorismatmutasegene aus dem gleichen Organismus oder gattungsverwandten Organismen die an der Lokalisation der Expression einer reduzierten, insbesondere  
30 keiner posttranslationalen Regulation unterliegen.

- Unter Organismen werden erfindungsgemäß prokaryontische Organismen oder eukaryontische Organismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen, Moose, Pilze oder Pflanzen, verstanden,  
35 die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch genetische Veränderung die vorstehend erwähnten Feinchemikalien herzustellen. Bevorzugte Organismen sind photosynthetisch aktive Organismen, wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, die bereits als Wildtyp in der Lage sind, die vorstehend  
40 erwähnten Feinchemikalien herzustellen.

Besonders bevorzugte Organismen sind Pflanzen.

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform der Maßnahme A des  
45 erfindungsgemäßen Verfahrens werden Chorismatmutasegene, die eine Chorismatmutase kodieren, deren Aktivität in Pflanzen einer

reduzierten posttranslationalen Regulation unterliegt, in Pflanzen eingebracht.

Beispielsweise sind dies einige bakterielle oder davon abge-  
5 leitete Chorismatmutasegene, also Nukleinsäuren, die ein Protein  
kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz einer bakteriellen  
Chorismatmutase deren Aktivität in Pflanzen einer reduzierten  
posttranslationalen Aktivität unterliegt, beispielsweise  
die nachstehend beschriebene Nukleinsäure kodierend für die  
10 Chorismatmutase Aktivität der Chorismatmutase-Prephenatdehydro-  
genase (tyrA) aus E. coli. oder eine von dieser Sequenz durch  
Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete  
Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 %, vorzugsweise  
mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, besonders bevor-  
15 zugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz der  
bakteriellen Chorismatmutase und die enzymatische Eigenschaft  
einer Chorismatmutase aufweist.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Aus-  
20 tausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere  
Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative  
Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine  
ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, bei-  
spielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val  
25 durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte  
Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini  
des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen  
30 Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptid-  
kette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere  
Aminosäuren ersetzt wird.

35 Unter Homologie zwischen zwei Proteinen wird vorzugsweise die  
Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge  
verstanden, vorzugsweise die Identität die durch Vergleich  
mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (UWGCG, University of  
40 Wisconsin, Genetic Computer Group) unter Einstellung folgender  
Parameter berechnet wird:

Gap Weight:	12
Length Weight:	4
45 Average Match:	2,912
Average Mismatch:	-2,003

## 10

Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz der vorstehend beschriebenen Chorismatmutase aus E. coli aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit  
5 der Sequenz der vorstehend beschriebenen Chorismatmutase, vorzugsweise nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 30 % aufweist.

Die bakteriellen oder davon abgeleiteten Chorismatmutasegene  
10 können auch Proteine kodieren die die Eigenschaft einer Chorismatmutase und die Eigenschaft eines weiteren Enzyms aufweisen, wie beispielsweise das nachstehend beschriebene Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Gen (tyrA) aus E.coli K12. Diese Ausführungsform ist, wie nachstehend beschrieben, besonders  
15 bevorzugt, wenn die Maßnahmen A und B in Kombination durchgeführt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Maßnahme A des erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere bei der Durch-  
20 führung der Maßnahme A alleine, werden die Chorismatmutasegene in spezifische Orte in den Organismus gebracht, an denen die entsprechenden Chorismatmutasen einer reduzierten posttranslationalen Regulation unterliegen.

25 Vorzugsweise werden dabei Nukleinsäuren, kodierend eine Chorismatmutase aus dem gleichen oder aus gattungsverwandten Organismen verwendet, die am Ort der Expression einer reduzierten posttranslationalen Regulation unterliegen.

30 Die Isoformen von Chorismatmutasen die aus unterschiedlichen Kompartimenten eines Organismus isoliert werden, weisen eine unterschiedliche Regulation auf.

Die entsprechenden Chorismatmutasegene aus einem spezifischen  
35 Kompartiment des Organismus oder aus gattungsverwandten Organismen können in andere Kompartimente des Organismus eingebracht werden, in denen die kodierten Chorismatmutasen keiner posttranslationalen Regulation unterliegen.

40 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens in Pflanzen wird zur Durchführung der Maßnahme A eine Nukleinsäure, codierend eine cytosolische Chorismatmutase aus Pflanzen in Plastiden von Pflanzen eingebracht.

45 Prinzipiell eignen sich dafür alle Nukleinsäuren, die eine cytosolische Chorismatmutase aus Pflanzen kodieren, vorzugsweise die Nukleinsäure kodierend eine cytosolische Chorismatmutase aus



## 11

Arabidopsis thaliana (Seq ID NO. 3) und davon abgeleitete natürliche oder nicht natürliche Nukleinsäuren.

Die Existenz verschiedener Isoformen der Chorismatmutase konnte  
5 für verschiedene Organismen nachgewiesen werden. So konnten aus Arabidopsis thaliana drei verschiedene Chorismatmutasen isoliert werden (Eberhard et al.1993. FEBS 334, 233-236; Eberhard et al.1996. Plant J. 10, 815-821; Mobley et al.1999.Gene 15;240(1):115-123).

10

Diese Isoformen unterschieden sich in ihrer Lokalisation als auch in ihren enzymatischen Eigenschaften. So ist die Chorismatmutase-1 plastidär lokalisiert und wird durch die aromatischen Aminosäuren allosterisch kontrolliert.

15

Das cytosolische Isoenzym Chorismatmutase-2 unterliegt keiner bekannten Regulation (Benesova, M. Bode, R, Phytochemistry 1992, 31, 2983-2987).

- 20 Unter Nukleinsäuren, kodierend eine cytosolische Chorismatmutase aus Arabidopsis thaliana und davon abgeleitete natürliche oder nicht natürliche Nukleinsäuren werden Nukleinsäuren verstanden, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der cytosolischen Chorismatmutase (SEQ ID NO. 4) oder eine von dieser  
25 Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 4 und die enzymatische Eigenschaft einer  
30 Chorismatmutase aufweisen.

Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 4 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem  
35 Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO. 4, vorzugsweise nach vorstehendem Programmalgorithmus mit vorstehenden Parametersatz eine Homologie von mindestens 30 % aufweist.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen  
40 Verfahrens wird eine Nukleinsäure, codierend die cytosolische Chorismatmutase aus Arabidopsis thaliana (SEQ ID NO. 4) in Plastiden von Pflanzen eingebracht.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-  
45 übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.



## 12

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Pflanze leicht ermitteln.

5

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine Nukleinsäure der Sequenz SEQ ID NO. 3 in Plastiden von Pflanzen eingebracht. Die Sequenz SEQ ID NO. 3 stellt das Gen der cytosolischen Chorismatmutase  
10 aus *Arabidopsis thaliana* (Chorismatmutase-2) dar.

Das Einbringen der Nukleinsäuren, codierend eine Chorismatmutase in Plastiden von Pflanzen kann beispielsweise, wie nachstehend für die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase näher beschrieben,  
15 durch Einbringen von Expressionskassetten in Pflanzen erreicht werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Chorismatmutase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische  
20 Transitpeptide, welche nach Translokation der cytosolischen Chorismatmutase in die Chloroplasten vom Chorismatmutase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des  
25 erfindungsgemäßen Verfahrens bringt man daher ein Nukleinsäure-konstrukt in die Pflanze ein, enthaltend eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid und eine Nukleinsäure die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution,  
30 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase aufweist.

35 Nukleinsäuren, codierend plastidäre Transitpeptide sind beispielsweise DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

40

pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
45 ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTACTGCGGGA  
TCC\_BamHI

## 13

pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
 5 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG  
 GATCC\_BamHI

pTP11

10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG  
 15 ATCC\_BamHI,

oder die Nukleinsäure, codierend das plastidäre Transitpeptid  
 der plastidären Chorismatmutase-1 aus *Arabidopsis thaliana*  
 (SEQ ID NO. 7):

20

KpnI\_GGCGTCATTGTTGATGAGATCGTCTTGTGCTCCTCTGCGATTGGTGGGTTCTTCGACCA  
 TCGACGTGAATTATCAACCTCAACACCCATTTCCACTCTTCTTCTTCCATCAACCAAATCT  
 TCTTTCTCTGTTCGTTGTTCTTCTTCTCAGCCATCAAAGCCACGCTCTGGAACCAGCTCTGTTCA  
 CGCCGTTATGACACTCG\_NCo1

25

Vorzugsweise wird zur plastidären Lokalisation einer cyto-  
 solischen Chorismatmutase die Nukleinsäure, codierend das  
 plastidäre Transitpeptid der plastidären Chorismatmutase-1  
 aus *Arabidopsis thaliana* verwendet.

30

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform des  
 erfindungsgemäßen Verfahrens bringt man daher ein Nukleinsäure-  
 konstrukt in die Pflanze ein, enthaltend eine Nukleinsäure  
 kodierend ein plastidäres Transitpeptid der plastidären  
 35 Chorismatmutase-1 aus *Arabidopsis thaliana* und eine Nuk-  
 leinsäure die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäure-  
 sequenz SEQ ID NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch  
 Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abge-  
 leitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 %  
 40 auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 4 und die  
 enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase aufweist.

Besonders bevorzugt wird für Maßnahme A des erfindungsgemäßen  
 Verfahrens ein Nukleinsäurekonstrukt enthaltend die Sequenz  
 45 (SEQ ID NO. 5) in Pflanzen eingebracht.

## 14

SEQ ID NO. 5 stellt ein Nukleinsäurekonstrukt aus der Nukleinsäure, codierend das plastidäre Transitpeptid der plastidären Chorismatmutase-1 aus *Arabidopsis thaliana* und der Nukleinsäure, codierend die cytosolische Chorismatmutase-2 aus *Arabidopsis thaliana* dar.

Die vorliegende Anmeldung betrifft insbesondere diese Nukleinsäurekonstrukte als auch deren Verwendung in der Maßnahme A des erfindungsgemäßen Verfahrens.

10

Figur 1 zeigt beispielsweise das Biosyntheschema ausgehend von Erythrose-4-Phosphat zu Vitamin E. Durch die zusätzliche Expression eines Chorismatmutasegens wird der Shikimatweg des Wildtyps genetisch verändert und der Metabolitfluß zu Hydroxyphenylpyruvat erhöht. Das nun vermehrt zur Verfügung stehende Hydroxyphenylpyruvat wird weiter in Richtung Tocopherole umgesetzt. Ein erhöhter Gehalt an Hydroxyphenylpyruvat führt zu einer erhöhten Umsetzung Richtung Vitamin E und/oder Vitamin K. Vorzugsweise führt ein erhöhter Gehalt an Hydroxyphenylpyruvat zu einer Erhöhung des Vitamin E-Gehalts.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt, wie nachstehend ausführlich beschrieben, durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Chorismatmutase-Nukleinsäure-Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Chorismatmutase-Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidäres Transitpeptid kodiert, also vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einem geeigneten, vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukt, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die Maßnahme B zur Veränderung des Shikimatweges des Wildtyps erfolgt, wie vorstehend ausgeführt durch Einbringen mindestens eines Gens in den Organismus zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist und das den Stoffwechselweg des Shikimatweges des Wildtyps überbrückt. Dieses Gen codiert ein Enzym, daß durch die neue enzymatische Aktivität eine Erhöhung des Stoffflusses zu der Zwischenverbindung bewirkt, bei der die Überbrückung endet. Diese neue enzymatische Aktivität unterliegt

## 15

vorzugsweise keiner Regulation durch den Organismus, schließt also den Stoffwechselweg kurz, um beispielsweise limitierende Regulationsstellen im Stoffwechsel zu umgehen. Dadurch ist es möglich, den Metabolitfluß zu limitierenden Substanzen von vor-  
5 handenen Regulationen zu entkoppeln.

Unter einem zum Wildtyp orthologen Gen wird ein Gen verstanden, daß aus einem anderen Organismus stammt, wobei die Enzymaktivität die das Gen kodiert bereits im Wildtyp vorhanden ist.

10

Dementsprechend wird unter der Formulierung "Gen, zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist" ein Gen aus einem anderen Organismus verstanden, wobei die Enzymaktivität die das Gen kodiert vor der Transformation im Wildtyp nicht vorhanden oder  
15 nicht aktiviert war.

Vorzugsweise wird unter einem zum Wildtyp orthologen Gen ein funktionelles Äquivalent aus einem anderen Organismus verstanden, wobei unter funktionellem Äquivalent die Gesamtheit der Eigen-  
20 schaften des Genproduktes (Protein) verstanden wird.

Dementsprechend wird vorzugsweise unter der Formulierung "Gen, zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist" ein Gen verstanden, zudem der Wildtyp kein funktionelles Äquivalent gemäß der vor-  
25 stehend gegebenen Definition besitzt und somit eine Stoffwechselleistung etabliert wird, die einen alternativen Stoffwechselweg erzeugt, um ein bereits in der Pflanze vorhandenes Produkt (enthaltenen Metaboliten) zu produzieren.

30 Unter Organismen werden erfindungsgemäß, wie vorstehend für Maßnahme A beschrieben, prokaryontische Organismen oder eukaryontische Organismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen, Moose, Pilze oder Pflanzen, verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch genetische Veränderung die vor-  
35 stehend erwähnten Feinchemikalien herzustellen. Bevorzugte Organismen sind photosynthetisch aktive Organismen, wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, die bereits als Wildtyp in der Lage sind, die vorstehend erwähnten Feinchemikalien herzustellen.

40

Besonders bevorzugte Organismen sind Pflanzen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man deshalb Pflanzen als zu  
45 transformierende Organismen. In diesem Fall eignen sich für die Durchführung der Maßnahme B vorzugsweise bakterielle Gene als Gene zu denen die Pflanze kein orthologes Gen aufweist.

## 16

In einer bevorzugten Ausführungsform der Maßnahme B des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Stoffwechselweg des Shikimatweges der Pflanze durch das mindestens eine eingebrachte Gen überbrückt.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Maßnahme B des erfindungsgemäßen Verfahrens bringt man eine Nukleinsäure, codierend eine Prephenatdehydrogenase in eine Pflanze ein. Für die bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens  
10 eignen sich alle Gene die eine Prephenatdehydrogenase kodieren.

Unter einer Prephenatdehydrogenase wird ein Enzym verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Prephenat in 4-Hydroxyphenylpyruvat umzuwandeln.

15

Beispiele für Nukleinsäuren, die eine Prephenatdehydrogenase codieren und im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind die bekannten und beispielsweise in Datenbanken im Internet zugänglichen Prephenatdehydrogenasegene aus *Lactococcus*  
20 *lactis* (Accession X78413), *Synechocystis* spec PCC 6803 (slr2081), *Deinococcus radiodurans* (AAF10695) oder *Bacillus subtilis* (P20692). Weitere Beispiele können durch Vergleich der Homologien der Sequenzen mit diesen bekannten Prephenatdehydrogenasegenen gefunden werden, wie beispielsweise die potentiellen Prephenat-  
25 dehydrogenase aus *Termotoga maitima* (AAD35430) oder *Helicobacter pylori* 26695 (Accession AAD08422).

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung eines Prephenatdehydrogenasegens bringt  
30 man man eine Nukleinsäure ein, die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz der Prephenatdehydrogenase aus *Synechocystis* spec PCC 6803 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 %, vorzugsweise  
35 mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz der Prephenatdehydrogenase aus *Synechocystis* spec PCC 6803 und die enzymatische Eigenschaft Prephenatdehydrogenase aufweist.

40 Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz der Prephenatdehydrogenase aus *Synechocystis* spec PCC 6803 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz der Prephenatdehydrogenase aus *Synechocystis* spec  
45 PCC 6803, vorzugsweise nach vorstehendem Programmalgorithmus mit vorstehenden Parametersatz eine Homologie von mindestens 30 % aufweist.



## 17

Figur 1 zeigt beispielsweise das Biosyntheschema ausgehend von Erythrose-4-Phosphat zu den Tocopherolen. Durch die zusätzliche Expression eines Prephenatdehydrogenase-Gens wird der Shikimatweg des Wildtyps genetisch verändert und der Metabolitfluß zu 5 Hydroxyphenylpyruvat erhöht. Das nun vermehrt zur Verfügung stehende Hydroxyphenylpyruvat wird weiter in Richtung Tocopherole umgesetzt. Ein erhöhter Gehalt an Hydroxyphenylpyruvat führt zu einer erhöhten Umsetzung Richtung Vitamin E und/oder Vitamin K. Vorzugsweise führt ein erhöhter Gehalt an Hydroxyphenylpyruvat 10 zu einer Erhöhung des Vitamin E-Gehalts.

Es ist jedoch vorteilhaft, gegebenenfalls in Kombination mit der erfindungsgemäßen Überbrückung des Stoffwechselweges weitere Enzyme des Shikimatweges überzuexprimieren, um einen erhöhten 15 Metabolitfluß zu den gewünschten Feinchemikalien zu erreichen.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher die Maßnahmen A und B in Kombination durchgeführt.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser erfindungsgemäßen Verfahrensvariante bringt man eine Nukleinsäure codierend eine Prephenatdehydrogenase in Kombination mit einer Nukleinsäure codierend eine Chorismatmutase in eine Pflanze ein.

25

Diese Kombination kann beispielsweise durch Einbringen von zwei Nukleinsäuren erfolgen, die jeweils ein Enzym mit der Aktivität einer Chorismatmutase und ein Enzym mit der Aktivität einer Prephenatdehydrogenase codieren. Für diese Ausführungsform ist 30 es notwendig, zwei verschiedene Nukleinsäuren, die jeweils eines dieser Enzyme kodieren, in die Pflanze einzubringen.

In einer insbesondere bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt diese Kombination in einer Nukleinsäure, in dem man eine Nukleinsäure, codierend eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase in eine Pflanze einbringt. 35

Das Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Gen, codiert ein Protein, daß sowohl die enzymatischen Eigenschaften einer 40 Chorismatmutase als auch einer Prephenatdehydrogenase aufweist. Dadurch wird durch Einbringen einer Nukleinsäure eine enzymatische Aktivität überexprimiert, bzw. eine enzymatische Aktivität eingebracht, die einer reduzierten posttranslationalen Regulation unterliegt (Chorismatmutase) und eine enzymatische 45 Eigenschaft (Prephenatdehydrogenase) neu eingeführt.



## 18

Unter einer Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase wird ein Enzym verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Chorismat in 4-Hydroxyphenylpyruvat umzuwandeln.

- 5 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform dieser erfindungsgemäßen Verfahrensvariante bringt man eine Nukleinsäure ein, die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete
- 10 Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aufweist.

15

Das Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 stellt die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase (tyrA) aus *E.coli* K12 dar.

- 20 Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO.2, vorzugsweise nach vorstehendem Programmalgorithmus mit vorstehenden Parameter-
- 25 satz eine Homologie von mindestens 30 % aufweist.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

- 30 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind, wie vorstehend beschrieben, durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
- 35 der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

- 40 Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- Weitere bevorzugte Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenasen bzw.
- 45 deren kodierende Nukleinsäuren sind insbesondere Nukleinsäuren bakterieller Herkunft, wie beispielsweise, die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenasegene aus *Erwinia herbicola* (Accession

## 19

X60420; Dieses Protein kann durch Deletion eines 109 Bp Bereiches am 5' Ende auch in eine monofunktionelle Prephenatdehydrogenase umgewandelt werden und dann beispielsweise wie vorstehend beschrieben als Prephenatdehydrogenase verwendet werden) oder  
5 Bordetella bronchiseptica (Accession AAF01289) oder lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz bekannt ist durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO. 2 oder den  
10 anderen vorstehend beschriebenen Sequenzen leicht auffinden, wie beispielsweise die potentielle Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenasegene aus Methanococcus janaschii (Accession Q58029).

Besonders bevorzugt verwendete Nukleinsäuren kodieren eine  
15 Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus Bakterien.

Eine besonders bevorzugt verwendete Nukleinsäure hat die Sequenz SEQ ID NO. 1. Diese Nukleinsäure stellt eine prokaryontische genomische DNA aus E. Coli K12 dar, die die Chorismatmutase-  
20 Prephenatdehydrogenase der Sequenz SEQ ID NO. 2, auch tyrA-Gen genannt, kodiert.

Figur 1 zeigt beispielsweise das Biosyntheschema ausgehend von Erythrose-4-Phosphat zu den Tocopherolen. Durch die zusätzliche Expression eines Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-  
25 Gens wird der Shikimatweg des Wildtyps genetisch verändert und der Metabolitfluß zu Hydroxyphenylpyruvat erhöht. Das nun vermehrt zur Verfügung stehende Hydroxyphenylpyruvat wird weiter in Richtung Tocopherole umgesetzt. Ein erhöhter Gehalt an Hydroxyphenylpyruvat führt zu einer erhöhten Umsetzung Richtung Vitamin  
30 E und/oder Vitamin K. Vorzugsweise führt ein erhöhter Gehalt an Hydroxyphenylpyruvat im erfindungsgemäßen Verfahren zu einer Erhöhung des Vitamin E-Gehalts.

35 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der transgenen Organismen ein Ernten der Organismen und ein Isolieren der Feinchemikalien aus den Organismen angeschlossen.

40 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren  
45 abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

## 20

Die Isolierung der Feinchemikalien aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, 5 Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

Die Isolierung von Vitamin E aus Öl-haltigen Pflanzen 10 erfolgt beispielsweise bevorzugt durch chemische Umwandlung und Destillation aus Pflanzenölen oder aus den bei der Desodorierung pflanzlicher Öle anfallenden Wasserdampfdestillate (Dämpferkondensate).

15 Weitere Isolierverfahren von Vitamin E aus Dämpferkondensaten sind beispielsweise in DE 31 26 110 A1, EP 171 009 A2, GB 2 145 079, EP 333 472 A2 und WO 94/05650 beschrieben.

Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Pflanzen 20 erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Pflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, daß die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, insbesondere die Nukleinsäuren codierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase oder die 25 vorstehen beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere das Nukleinsäurekonstrukt, kodierend für ein plastidäres Transitpeptid und eine cytosolische Chorismatmutase enthält, wobei diese Nukleinsäuren

30 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz oder das kodierende Nukleinsäurekonstrukt mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressions- 35 kassetten genannt.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner als Expressionskassette fungierende Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine, vorstehend beschriebene Nukleinsäure, insbesondere die Nukleinsäure codierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase 40 oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase oder die vorstehen beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere das Nukleinsäurekonstrukt, kodierend für ein plastidäres Transitpeptid und eine cytosolische Chorismatmutase, die mit einem oder 45 mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation im Wirtsorganismus, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

## 21

Vorzugsweise enthält die Expressionskassette eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid, das die Lokalisation in Plastiden gewährleistet.

- 5 Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor, und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
- 20 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

45 Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen tyrA-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert



## 22

werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetra-  
5 zyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

- 10 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese der entsprechenden Feinchemikalien, insbesondere Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blatt-  
15 spezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-245).

- Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremd-  
20 protein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-  
25 Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459-467), LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995), Sucrose-Bindeprotein-Promotor (Zitat), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

- 30 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten, vorstehend beschriebenen Nukleinsäure-Sequenz, insbesondere der Nukleinsäure-Sequenz codierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydro-  
35 genase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch  
40 und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY  
45 (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Mole-

## 23

cular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind insertierte Sequenzen, die, wie  
5 vorstehend für die Chorismatmutase beschrieben, ein Targeting in den Plastiden gewährleisten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Fusionsprotein, insbesondere ein  
10 Chorismatmutase-, Prephenatdehydrogenase- oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der  
15 Proteine, insbesondere der Chorismatmutase, Prephenatdehydrogenase oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase in die Chloroplasten vom Proteinteil, insbesondere vom Chorismatmutase-, Prephenatdehydrogenase- bzw. Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist  
20 das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

25 Für die Verwendung der cytosolischen Chorismatmutase bzw. der Nukleinsäure, codierend eine cytosolische Chorismatmutase ist, wie vorstehend beschrieben, insbesondere die Verwendung des Transitpeptids der plastidären Chorismatmutase, bzw. deren  
30 kodierende Nukleinsäure bevorzugt.

Besonders bevorzugt bei der erfindungsgemäßen Verwendung der anderen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären  
35 Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

40 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCGCCGCGCCGCGCGTTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGGGGA  
TCC\_BamHI

45



pTP10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
 5 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCGCCGCGCCGCGCGTGC  
 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG  
 GATCC\_BamHI

pTP11

10

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCGCCGCGCCGCGCGTGC  
 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCCTG  
 15 ATCC\_BamHI

Ein weiteres Beispiel für ein plastidäres Transitpeptid ist  
 das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Iso-  
 merase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana*.

20

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, insbesondere die Nuklein-  
 säuren codierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydro-  
 genase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase können  
 synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine  
 25 Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestand-  
 teilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Gen-  
 abschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische  
 30 Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt  
 werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons  
 mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den  
 meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.  
 35 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene  
 DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu  
 erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest  
 und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die  
 Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente  
 40 Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-  
 Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-  
 linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die  
 45 Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel  
 hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis  
 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb

## 25

der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vor-  
5 zugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- 10 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktions-schnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese,  
15 "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung  
20 gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*,  
25 insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend  
30 beschriebenen Nukleinsäuren, insbesondere der Nukleinsäuren kodierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase oder der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Proteine, insbesondere der Chorismatmutasen, der Prephenatdehydrogenasen oder der  
35 Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenasen zur Herstellung von transgenen Pflanzen.

Vorzugsweise weisen diese transgenen Pflanze gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Feinchemikalien, insbesondere  
40 an Ubichinon, Vitamin E und/oder Vitamin K, vorzugsweise an Vitamin E auf.

Es ist bekannt, daß Pflanzen mit einem hohen Vitamin-E-Gehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweisen.  
45 Unter abiotischem Streß wird beispielsweise Kälte, Frost, Trockenheit, Hitze und Salz verstanden.

## 26

Daher betrifft die Erfindung weiterhin die Verwendung der vorstehend erwähnten Nukleinsäuren zur Herstellung transgener Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweisen.

5

Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können zur Herstellung von Feinchemikalien in transgenen Organismen, vorzugsweise zur Herstellung von Vitamin E, Vitamin K und/oder Ubichinon, insbesondere Vitamin E in transgenen Pflanzen verwendet werden.

10

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus, insbesondere einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Dazu können insbesondere bei Pflanzen an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

15

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

20

25

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

30

Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten.

40

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

45

## 27

Die Expressionskassette kann über die Pflanzen hinaus auch zur Transformation von Bakterien, insbesondere Cyanobakterien, Moosen, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen eingesetzt werden.

- 5 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die ein erfindungsgemäßes Protein, insbesondere eine Chorismatmutase, Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase kodiert,  
10 vorzugsweise in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.

Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere  
15 von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter  
20 anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter  
25 Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines erfindungsgemäßen Gens, insbesondere einer Nukleinsäure kodierend eine eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase enthalten.

30 Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Chorismatmutase, Prephenatdehydrogenase oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten  
35 Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

40 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in ein Derivat des Transformationsvektors pBin-19 mit 35s Promotor (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)) eingebaut werden. Figur 2 zeigt ein Derivat des Transformations-  
45 vektors pBin-19 mit samenspezifischem Legumin B4-Promotor.

## 28

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. 5 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der vorstehend 10 beschriebenen Nukleinsäuren, insbesondere die Nukleinsäuren kodierend eine Chorismatmutase, Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase, der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere der Expressionskassetten zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen oder 15 zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes der Pflanze oder Pflanzenteile an Feinchemikalien, insbesondere des Gehalts an Vitamin E, Vitamin K oder Ubichinon, vorzugsweise an Vitamin E.

20

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen, Blütenblättern oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen.

25 Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen indem man eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

30

Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine kodierend eine Chorismatmutase, Prephenatdehydro- 35 genase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase in eine Pflanzenzelle oder Protoplasten von Pflanzen einbringt und diese zu ganzen Pflanzen regeneriert.

Die Erfindung betrifft auch die genetisch veränderte Organismen, 40 wobei die genetische Veränderung den Metabolitfluß des Shikimatweges gegenüber dem Wildtyp verändert und der Organismus gegenüber dem Wildtyp einen veränderten Gehalt an Feinchemikalien aufweist.

45 Wie vorstehend erwähnt, weisen bevorzugte genetisch veränderte Organismen einen erhöhten Gehalt an Feinchemikalien, insbesondere einen erhöhten Gehalt an Vitamin E, Vitamin K und Ubichinon,



## 29

vorzugsweise einen erhöhten Gehalt an Vitamin E gegenüber dem Wildtyp auf.

Unter einem genetisch veränderter Organismus wird erfindungsgemäß  
5 insbesondere ein Organismus verstanden, bei dem die genetische Veränderung die Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Chorismatmutase, Prephenatdehydrogenase oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase gegenüber einem Wildtyp

10 für den Fall, daß der Ausgangsorganismus die entsprechende Nukleinsäure enthält, erhöht oder

für den Fall, daß der Ausgangsorganismus die entsprechende Nukleinsäure nicht enthält, verursacht.

15

Als Organismen und zur Herstellung von Organismen mit einem erhöhten Gehalt an Feinchemikalien im Vergleich zum Wildtyp werden in einer bevorzugten Ausführungsform, wie vorstehend erwähnt, photosynthetisch aktive Organismen wie beispielsweise  
20 Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, besonders bevorzugt Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet.

Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren  
25 Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind insbesondere mono- und dikotyle Pflanzen.

30

Bevorzugte Pflanzen sind Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis,  
35 Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und Weinspezies oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*,  
40 *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Canola, Kartoffeln sowie weitere Ölsaaten, wie beispielsweise Soja.

Die genteilsch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben zur Herstellung von Fein-  
45 chemikalien, insbesondere zur Herstellung von Vitamin E, Vitamin K und Ubichinon verwendet werden.



## 30

Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Feinchemikalien, insbesondere mit einem erhöhten Gehalt an Vitamin-E, Ubichinon und/oder Vitamin K, vorzugsweise Vitamin E können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

Erhöhung des Gehaltes an Feinchemikalien bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Tocopherol verstanden. Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird aber auch insbesondere ein veränderter Gehalt der vorstehend beschriebenen 8 Verbindungen mit Tocopherolaktivität verstanden.

Beispielsweise führt das Einbringen eines Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Gens in Pflanzen überraschenderweise zu einem besonders erhöhten Anstieg des Gehalts an Tocotrienolen.

Im Falle der Erhöhung des Gehalts an Vitamin E kann sowohl der Gehalt an Tocopherolen oder Tocotrienolen gesteigert werden. Vorzugsweise wird der Gehalt an Tocopherolen gesteigert. Aber es ist auch möglich unter bestimmten Bedingungen vorzugsweise den Gehalt an Tocotrienolen zu steigern.

Der Biosyntheseort von Vitamin E beispielsweise ist in Pflanzen unter anderem das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, insbesondere der Nukleinsäuren codierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase sinnvoll ist. Dies ist jedoch nicht einschränkend, da die Expression auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - besonders in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft deshalb eine samenspezifische Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, insbesondere der Nukleinsäuren codierend eine Chorismatmutase, eine Prephenatdehydrogenase oder eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenases.

## 31

Darüber hinaus ist eine konstitutive Expression von exogenen Chorismatmutase-, Prephenatdehydrogenase- oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Genen von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

5

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten Chorismatmutase-, Prephenatdehydrogenase- oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art  
10 und Höhe veränderte Expression des Chorismatmutase-, Prephenatdehydrogenase- oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

15 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

20

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

25

Beispiel 1 - Klonierung des *tyrA*-Gens kodierend für die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12

Die DNA kodierend für das *tyrA*-Gen wurde mittels *polymerase chain reaction* (PCR) aus *E.coli* K12 unter Verwendung eines sense  
30 spezifischen Primers (*tyrA*5' SEQ ID NO. 10) und eines antisense spezifischen Primers (*tyrA*3' SEQ ID NO. 9) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

35

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2 µl einer *E.coli* K12 Zellsuspension
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 40 - 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 µg Rinderserum-Albumin
- 40 pmol *tyrA*5'
- 40 pmol *tyrA*3'
- 15 µl 3,3 × rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 45 - 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

## 32

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- 5 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Schritt 6: 4°C (Warteschleife)

10

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers bestätigt.

15

Beispiel 2 - Herstellung von Expressionskassetten enthaltend das *tyrA*-Gen, kodierend für die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12

- 20 Transgene *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden erzeugt, die die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12 unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980) exprimieren. Die Grundlage der zur konstitutiven Expression
- 25 der Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12 erzeugten Plasmides war der pBinAR-TkTp-10 (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Dieser Vektor ist ein Derivat des pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66: 221-230, 1990) und enthält den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck
- 30 et al., 1980) das Terminations-signal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-846, 1984) sowie die für das Transitpeptid der *Nicotiana tabacum* plastidären Transketolase kodierende DNA Sequenz. Die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters erfolgte Klonierung der Chorismatmutase-Prephenat-
- 35 dehydrogenase aus *E.coli* K12 in diesen Vektor, erzeugt eine Translationsfusion der Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase mit dem plastidären Transitpeptid. Dadurch erfolgt ein Transport des Transgens in die Plastiden.

- 40 Zur Erstellung dieses Plasmides wurde das *tyrA*-Gen unter Verwendung der flankierenden *Sma*I bzw. *Sal*I Restriktionsschnittstellen aus dem Plasmid pGEM-T/*tyrA* isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardmethoden in einen *Sma*I / *Sal*I geschnittenen pBinAR-TkTp-10 ligiert (siehe Figur 2). Dieses
- 45 Plasmid (pBinAR-TkTp-10/*tyrA*) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum* und *A.thaliana* Pflanzen verwendet.

## 33

Fragment A (529 bp) in Figur 2 beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (245bp) kodiert für das Transitpeptid der *Nicotiana tabacum* Transketolase, Fragment C (1232 Bp) kodiert für das tyrA-Gen aus *E.coli* K12, Fragment D (219Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 3 - Erzeugung von Nukleinsäurekonstrukten zur Expression der Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Arabidopsos thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *Brassica napus* Pflanzen, die die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pPTVkanLeP-IPP-TP-9 verwendet.

Dieser Vektor ist ein Derivat des pGPTVkan (D. Becker, E. Kemper, J. Schell, R. Masterson. *Plant Molecular Biology* 20: 1195-1197, 1992) dem das uidA Gen deletiert wurde. Stattdessen enthält der Vektor pPTVkanLeP-IPP-TP-9 den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., *Nuc. Acid. Res.*, 14(6):2707-2720, 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht) und das Terminationssignal der Nopalinsynthase aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561-73, 1982).

Das Nukleinsäure-Fragment kodierend für die tyrA aus *E.coli* K12 wurde als SmaI/SalI Fragment mit durch die T4-Polymerase aufgefüllten stumpfen Enden in den Vektor pPTVkanLeP-IPP-TP-9 (Figur 3) kloniert, wodurch eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt wurde. Somit konnte ein Import der Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase in die Plastiden gewährleistet werden. Dieses Plasmid (pPTVkanLeP-IPP-TP-9/TyrA) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum*, *A.thaliana* bzw. *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2700 bp) in Figur 3 beinhaltet den Promotor des Legumin B4 Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (206bp) Fragment kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1234Bp) kodiert für das tyrA-Gen aus *E.coli* K12. Fragment D (272Bp) für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

## 34

Beispiel 4 - Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen,  
die das tyrA-Gen exprimieren

Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) wurden mit dem  
5 *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage  
einer modifizierten Vakuuminfiltrationsmethode transformiert  
(Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method  
for *Agrobacterium* mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J  
16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pelltier, G.,  
10 in: Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration  
of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CRAcad Sci Paris, 1993,  
1144(2):204-212). Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens*  
Zellen waren im Vorfeld mit den Plasmiden pBinAR-TkTp-10/tyrA  
bzw. pPTVkanLeP-IPP-TP-9/tyrA (Figur 2 bzw. 3) transformiert  
15 worden.

Samen der Primärtransformanten wurden auf Grundlage der  
Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente  
Keimlinge wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte  
20 Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

Beispiel 5 - Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen,  
die das tyrA-Gen exprimieren

25 Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an  
einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer  
to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab  
Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die  
Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

30

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens*  
Stamm GV3101 [pMP90]. Zur Transformation wurde das Plasmid  
pPTVkanLeP-IPP-TP-9/tyrA verwendet (Figur 3). Samen von *Brassica*  
*napus* var. Westar wurden mit 70 % Ethanol (v/v) oberflächensteril  
35 gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1%iger  
Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Tween 20) für  
20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils  
20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filter-  
papier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml  
40 Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen  
(ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die  
verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten.  
Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml  
Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach  
45 Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium wurden die Kulturen für  
24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.



## 35

- Vom *Agrobacterium* Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 eingestellt.
- 10 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 15 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten 20 wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

- Zur Regeneration wurden jeweils 20 bis 30 Explante in 90 mm 25 Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen 30 mit Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

## 35

Beispiel 6 - Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen, die das tyrA-Gen exprimieren

- Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l 40 Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM MgSO<sub>4</sub>.) wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen 45 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Transformation eingesetzt.



## 36

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch vegetative Replikation erhalten. Dazu wurde nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze wurden die Haare auf  
5 der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter wurden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Die Agrobakterienkultur wurde in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke wurden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf  
10 2MS-Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berührten. Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C wurden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium mußte  
alle 7 bis 10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bildeten,  
15 wurden die Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat trat Organogenese  
20 ein und die gebildeten Sprosse konnten abgeschnitten werden. Die Kultivierung der Sprosse wurde auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen gebildet hatte, konnten die Pflanzen in Pikiererde getopft werden.

25

Beispiel 7 - Charakterisierung der transgenen Pflanzen aus  
Beispiel 4, 5 und 6

Es wurden die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter  
30 und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum*) analysiert. Dazu wurden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aus *E.coli* K12 exprimieren  
35 auf Northern- und Western Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen wurde der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt mittels HPLC ermittelt. In allen Fällen war der Tocopherol- und/oder Tocotrienol-Gehalt in transgenen Pflanzen, die zusätzlich ein tyrA-Gen exprimieren, im Vergleich zu nicht trans-  
40 formierten Pflanzen erhöht.

Tabelle 1A (junge Blätter) und 1B (seneszierende Blätter) zeigen die Gehalte [ $\mu$ g/gFG] an  $\alpha$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\alpha$ -Tocotrienol und Gesamt-Vitamin E in Blättern unterschiedlichen Alters in  
45 *Nicotiana tabacum*, cv. SNN-Wildtyp (angegebene Werte MW +/-SD, n = 9) und Pflanzen, die das Tyr A Gen aus *E. coli* überexprimieren.

Tabelle A: junge Blätter

	$\alpha$ -Tocopherol		$\gamma$ -Tocopherol		$\alpha$ -Tocotrienol	Gesamt Vitamin E	
5 Wildtyp SNN	19,0	$\pm 2,9$	0,31	$\pm 0,03$	<0,20	19,3	$\pm 2,8$
Linie 8	27,6		1,25		1,03	30,0	
Linie 15	35,7		0,73		1,00	37,4	
Linie 54	32,3		4,60		1,60	38,7	
Linie 86	15,7		4,47		0,98	21,4	
10 Linie 113	32,3		0,71		0,62	33,6	

Tabelle B: seneszierende Blätter

	$\alpha$ -Tocopherol		$\gamma$ -Tocopherol		$\alpha$ -Tocotrienol	Gesamt Vitamin E	
15 Wildtyp SNN	32,9	$\pm 2,1$	0,31	$\pm 0,05$	<0,20	33,1	$\pm 2,1$
Linie 8	50,7		0,69		2,69	54,2	
Linie 15	54,7		0,69		0,81	56,2	
20 Linie 54	37,0		2,60		0,35	40,0	
Linie 86	36,5		1,51		0,43	38,4	
Linie 113	46,2		0,45		2,29	48,9	

- 25 Beispiel 8 - Klonierung eines Subfragmentes des Gens kodierend für die plastidär exprimierte Chorismat Mutase-1 aus *Arabidopsis thaliana*

30 Die DNA Sequenz kodierend für das Transitpeptid des Chorismat-Mutase-1-Gen wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (CM-1TP 5' SEQ ID Nr. 11) und eines antisense spezifischen Primers (CM-1TP 3' SEQ ID NO. 12) amplifiziert.

- 35 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:  
Die PCR erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2  $\mu$ l einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 40 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5  $\mu$ g Rinderserum-Albumin
- 40 pmol CM-1TP 5'Primer
- 40 pmol CM-1TP 3'Primer
- 45 - 15  $\mu$ l 3,3  $\mu$  rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

## 38

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- 5 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Schritt 6: 4°C (Warteschleife)

10

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pCR-Script (Stratagene) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons wurde durch Sequenzierung unter Verwendung eines Vektor-spezifischen Primers bestätigt.

15

Beispiel 9 - Klonierung des Gens kodierend für die cytosolisch exprimierte Chorismat Mutase-2 aus *Arabidopsis thaliana*

- 20 Die DNA kodierend für das *Chorismat-Mutase-2*-Gen wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (CM-2 5' SEQ ID NO. 13) und eines antisense spezifischen Primers (CM-2 3' SEQ ID NO. 14) amplifiziert.

25

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:  
Die PCR erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 30 - 2 µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>
- 5 µg Rinderserum-Albumin
- 40 pmol CM-2 5'Primer
- 35 - 40 pmol CM-2 3'Primer
- 15 µl 3,3 µ rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

40

45

## 39

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- 5 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2 bis 4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Schritt 6: 4°C (Warteschleife)

10

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers bestätigt.

15

Beispiel 10 - Erzeugung des chimären Genkonstruktes CM-1-TP-CM-2 bestehend aus der DNA Sequenz kodierend für das Transitpeptid (TP) der Chorismatmutase-1 (CM-1) und der DNA Sequenz kodierend für die Chorismatmutase-2 (CM-2)

20

Zur Erzeugung des chimären Gens CM-1-TP-CM-2, wurde das Plasmid pCR-Script/CM-1-TP mit den Restriktionsenzyme NcoI/SalI verdaut.

- 25 In dieses Plasmid wurde das aus dem Plasmid pGEM-Teasy/CM-2 mittels der Restriktionsenzyme NcoI/SalI isolierte DNA-Fragment der CM-2 ligiert. Die Translation dieses chimären DNA-Konstruktes (SEQ ID No. 5) (pCR-Script/AtCM-1TP-AtCM-2, Figur 4 hat die Bildung eines Fusionsproteins zur Folge, indem das Transitpeptid
- 30 der CM-1 mit der CM-2 kombiniert ist (SEQ ID NO. 6).

Beispiel 11 - Herstellung pflanzlicher Expressionskassetten enthaltend das chimäre Gen CM-1-TP-CM-2

- 35 Transgene Pflanzen wurden erzeugt, die das chimäre Gen CM-1-TP-CM2 aus A.thaliana zum einen unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., Cell 21: 285-294, 1980) und zum anderen unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors des Legumin Gens aus
- 40 Vicia faba (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6): 2707-2720, 1986) exprimieren.

- Die Grundlage des zur konstitutiven Expression des chimären Gens CM-1TP-CM-2 war der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant
- 45 Sci. 66: 221-230, 1990). Dieser Vektor enthält den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980) und das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO

## 40

- J. 3: 835-846, 1984). Zur Erstellung dieses Plasmides wurde das chimäre Gen CM-1-TP-CM2 unter Verwendung der flankierenden Restriktionsschnittstellen KpnI/SalI aus dem Plasmid pCR-Script/AtCM-1TP-AtCM-2 (Abb. 4) isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardmethoden in einen KpnI/SalI geschnittenen pBinAR ligiert. Das resultierende Plasmid (pBinAR/CM-1TP/CM-2, Abb. 5) wurde zur Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* verwendet.
- 10 Zur Erzeugung eines Plasmides, welches die samenspezifische Expression des chimären Gens CM-1TP/CM-2 in Pflanzen ermöglicht, wurde der samenspezifische Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., Nuc. Acid. Res., 14(6):2707-2720, 1986) verwendet. Aus dem Plasmid pGEMTeasy/lePNOS wurde das 2,7 Kb Fragment des Legumin B4
- 15 Gen Promotors unter Verwendung der den Promotor 5' flankierenden EcoRI und der 3' flankierenden KpnI Schnittstellen isoliert. Das Plasmid pBinAR/CM-1TP/CM-2 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen EcoRI und KpnI behandelt. Dies hatte zur Folge, daß der 35S-Promotor des CaMV aus diesem Plasmid herausgetrennt wurde,
- 20 siehe Figur 5). Der Promotor des Legumin Gens wurde anschließend als EcoRI/KpnI Fragment in diesen Vektor kloniert, wodurch ein Plasmid erzeugt wurde, welches die Expression des chimären Gens CM-1TP-CM-2 unter die Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors stellte, siehe Figur 6). Dieses Plasmid (pBinLeP/
- 25 CM-1TP/CM-2) wurde zur Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana*, und *Nicotiana tabacum* Pflanzen verwendet.

Beispiel 12 - Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die das chimären Gen CM-1-TP-CM-2 exprimieren

30

Die Herstellung der Pflanzen erfolgte analog zu Beispiel 4 unter Verwendung der Plasmide (pBinAR/AtCM-1TP/CM-2) und (pBinLeP/CM-1TP/CM-2).

35 Beispiel 13 - Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die das tyrA-Gen exprimieren

Die Herstellung der Pflanzen erfolgte analog zu Beispiel 5 unter Verwendung der Plasmide (pBinAR/AtCM-1TP/CM-2) und (pBinLeP/

40 CM-1TP/CM-2).

## 41

Beispiel 14 - Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen,  
die das tyrA-Gen exprimieren

Die Herstellung der Pflanzen erfolgte analog zu Beispiel 6 unter  
5 Verwendung der Plasmide (pBinAR/AtCM-1TP/CM-2) und (pBinARleP/  
CM-1TP/CM-2).

Beispiel 15 - Charakterisierung der transgenen Pflanzen aus  
Beispiel 12, 13 und 14

10

Es wurden die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter  
und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten  
Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana*  
*tabacum*) analysiert. Dazu wurden die transgenen Pflanzen im  
15 Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für  
die cytosolische Chorismatmutase exprimieren auf Northern- und  
Western Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen  
wurde der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt mittels HPLC  
ermittelt. In allen Fällen war der Tocopherol- und/oder Toco-  
20 trienol-Gehalt in transgenen Pflanzen, die zusätzlich Chorismat-  
mutase-Gene exprimieren, im Vergleich zu nicht transformierten  
Pflanzen erhöht.

25

30

35

40

45



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Feinchemikalien durch Kultivierung von Organismen die gegenüber dem Wildtyp einen genetisch veränderten Shikimatweg aufweisen.  
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur genetischen Veränderung des Shikimatweges mindestens eine Maßnahme ausgewählt aus der Gruppe der Maßnahmen A und B durchführt, wobei A und B folgende Bedeutung haben:  
10  
A: Erhöhung der Aktivität mindestens eines Enzyms des Shikimatweges des Wildtyps;  
15  
B: Einbringen mindestens eines Gens in den Organismus zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist und das den Stoffwechselweg des Shikimatweges des Wildtyps überbrückt.  
20
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man bei Maßnahme A die Aktivität mindestens eines Enzyms des Shikimatweges durch Überexpression von Nukleinsäuren erhöht, die Proteine mit dieser enzymatischen Aktivität codieren.  
25
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure, codierend eine Chorismatmutase in den Organismus einbringt.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure codierend eine Chorismatmutase in den Organismus einbringt, deren Aktivität einer reduzierten posttranslationalen Regulation im Organismus unterliegt.
- 35 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure codierend eine Chorismatmutase in den Organismus einbringt die an der Lokalisation der Expression im Organismus einer reduzierten posttranslationalen Regulation unterliegt.  
40
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.
- 45 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man eine cytosolische Chorismatmutase in Plastiden einer Pflanze einbringt.

## 43

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Nukleinsäurekonstrukt in die Pflanze einbringt, enthaltend eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid und eine Nukleinsäure die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 4 und die enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase aufweist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure, kodierend ein plastidäres Transitpeptid eine Nukleinsäure verwendet, die das plastidäre Transitpeptid einer plastidären Chorismatmutase kodiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Nukleinsäurekonstrukt der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO. 5 in Pflanzen einbringt.
12. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid und eine Nukleinsäure die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 4 und die enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase aufweist.
13. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure, kodierend ein plastidäres Transitpeptid eine Nukleinsäure verwendet, die das plastidäre Transitpeptid einer plastidären Chorismatmutase kodiert.
14. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es die Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO. 5 aufweist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus eine Pflanze verwendet und daß man bei Maßnahme B als Gen zu dem der Wildtyp kein orthologes Gen aufweist eine Nukleinsäure codierend eine Prephenatdehydrogenase in eine Pflanze einbringt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure codierend eine Prephenatdehydrogenase in Kombination mit einer Nukleinsäure codierend eine Chorismatmutase in eine Pflanze einbringt.
- 5
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure codierend eine Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase in eine Pflanze einbringt.
- 10
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure einbringt, die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aufweist.
- 15
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure bakterieller Herkunft verwendet.
- 20
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure verwendet, die die in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz enthält.
- 25
21. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, 8 und 15 bis 17, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 30
22. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 21, enthaltend zusätzlich eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid.
- 35
23. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 22, enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 12.
- 40
24. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 22, enthaltend eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid und eine Nukleinsäure die ein Protein kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase aufweist.
- 45

## 45

25. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, 8 und 15 bis 17 und der Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 und 21 bis 24 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
- 5
26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Feinchemikalien aufweist.
- 10
27. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die transgene Pflanze gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweist.
- 15
28. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung den Metabolitfluß des Shikimatweges gegenüber dem Wildtyp verändert und der Organismus gegenüber dem Wildtyp einen veränderten Gehalt an Feinchemikalien aufweist.
- 20
29. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 28, wobei die genetische Veränderung die Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Chorismatmutase, Prephenatdehydrogenase oder Chorismatmutase-Prephenatdehydrogenase gegenüber einem Wildtyp
- 25
- für den Fall, daß der Ausgangsorganismus die entsprechende Nukleinsäure enthält, erhöht oder
- für den Fall, daß der Ausgangsorganismus die entsprechende Nukleinsäure nicht enthält, verursacht.
- 30
30. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 29, transformiert mit einem Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 21 bis 24.
- 35
31. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 29, enthaltend einem Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 21 bis 24.
- 40
32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.
- 45
33. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 28 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, 8 und 15 bis 17 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 12 bis

## 46

14 und 21 bis 24 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

5 34. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 28 bis 32 zur Herstellung von Feinchemikalien.

35. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 28 bis 32 als Futter- und Nahrungsmittel oder zur Herstellung von prozessierten Lebensmittel.

10

36. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, 8 und 15 bis 17 und der Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 und 21 bis 24 zur Erhöhung des Gehalts an Feinchemikalien in Organismen.

15

37. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, 8 und 15 bis 17 und der Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 und 21 bis 24 zur Herstellung von Feinchemikalien in Organismen.

20

25

30

35

40

45

FIG.1

1/6

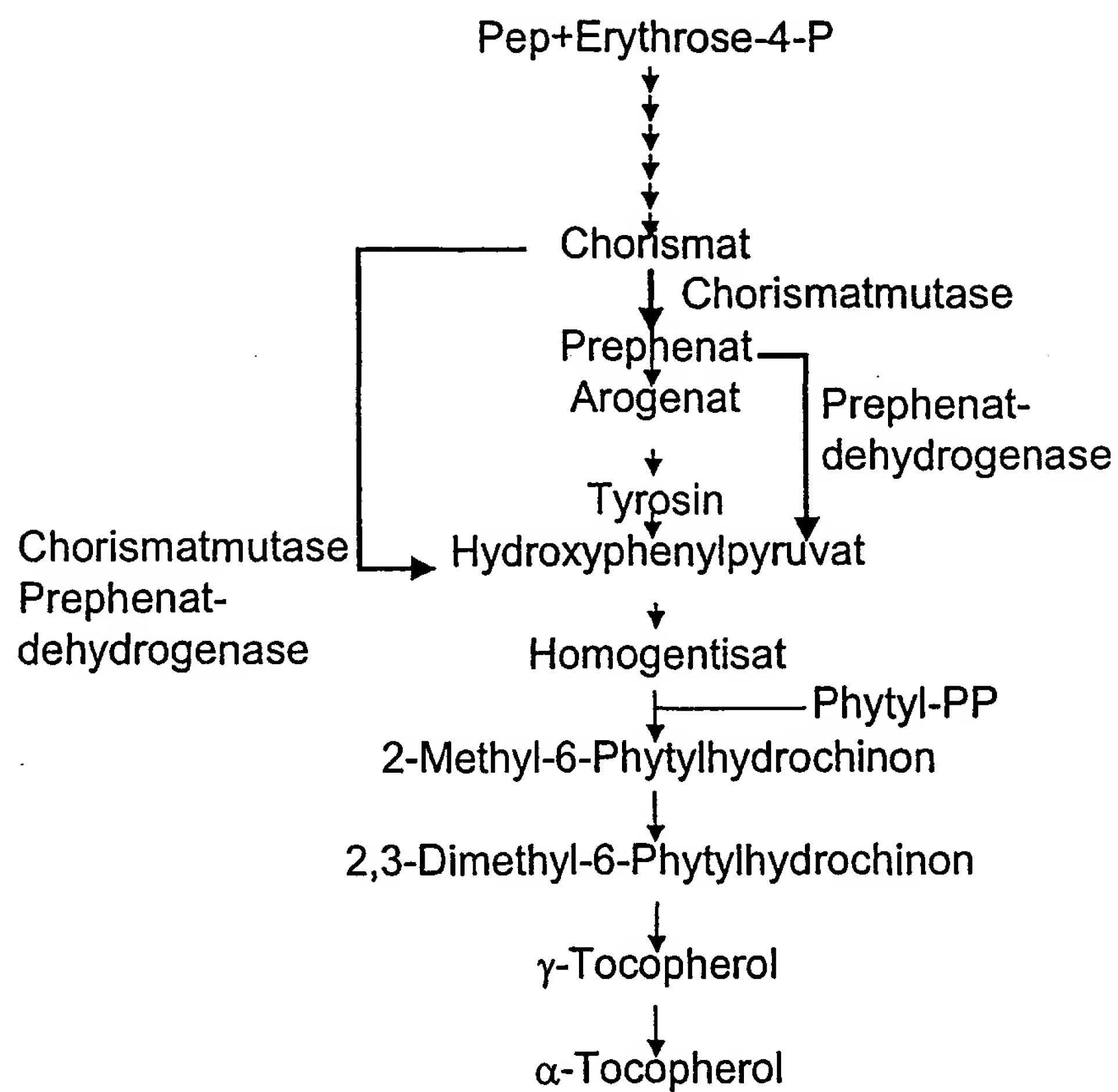




FIG.2

2/6

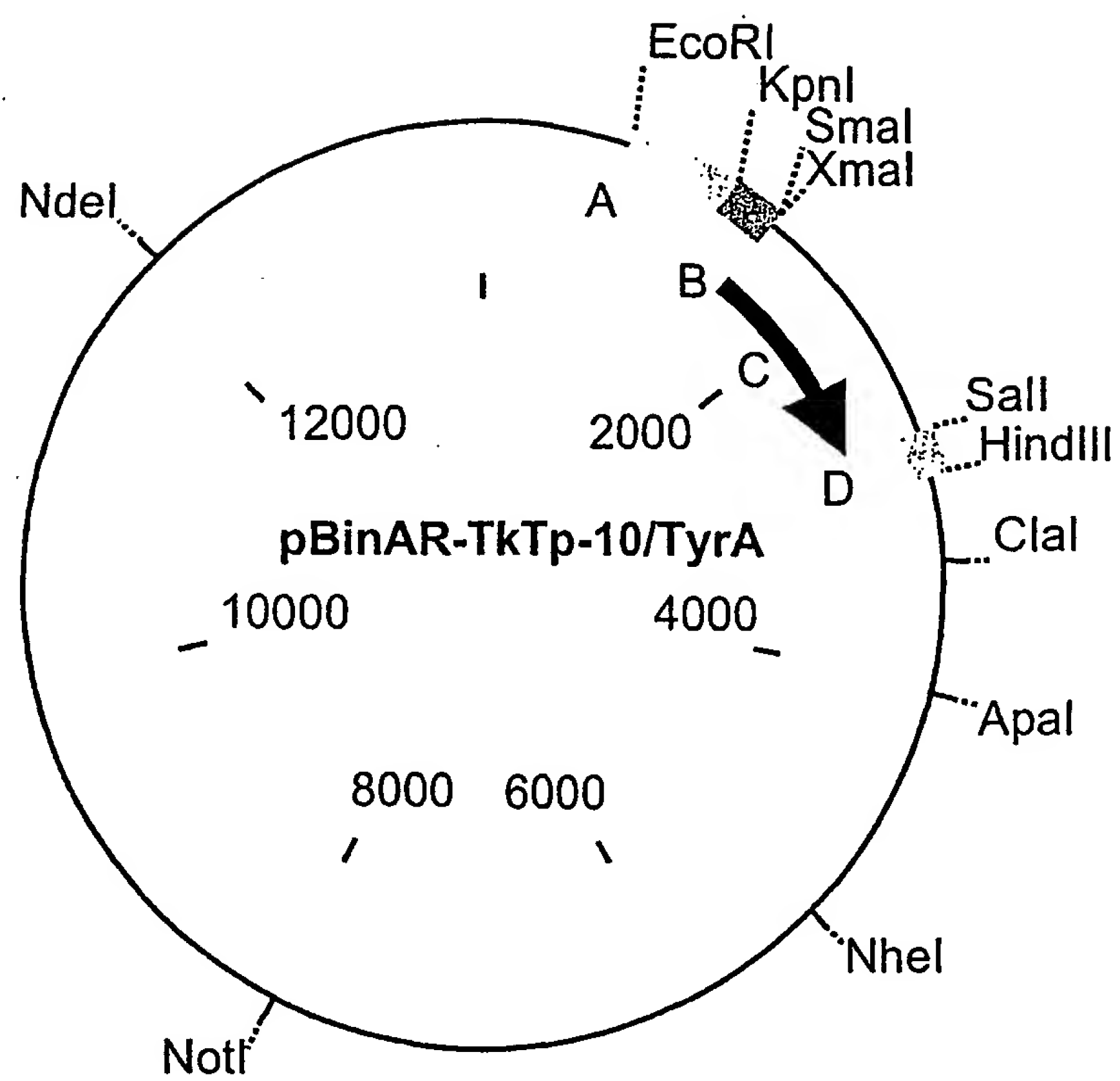


FIG.3

3/6

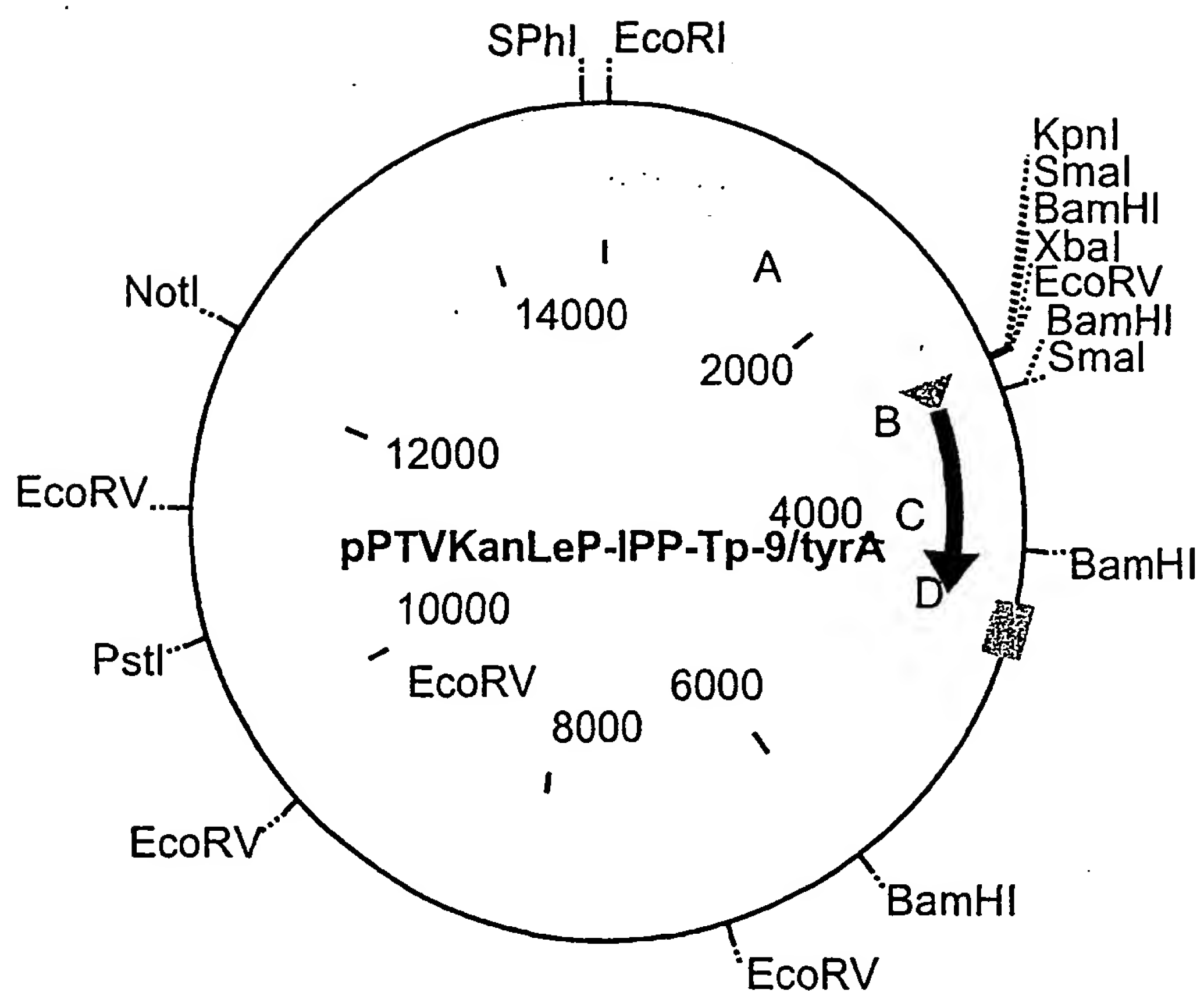


FIG.4

4/6

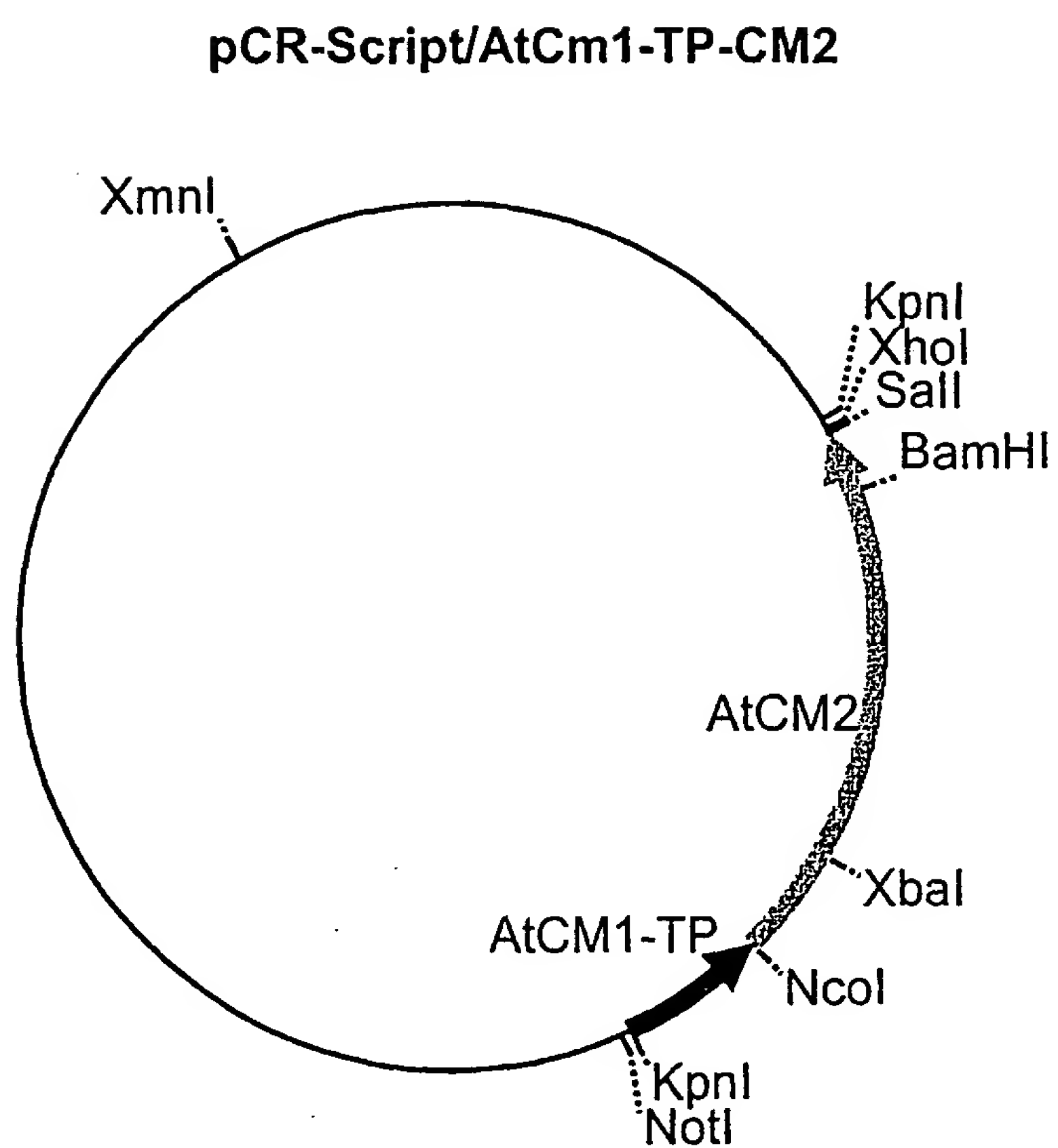


FIG.5

5/6

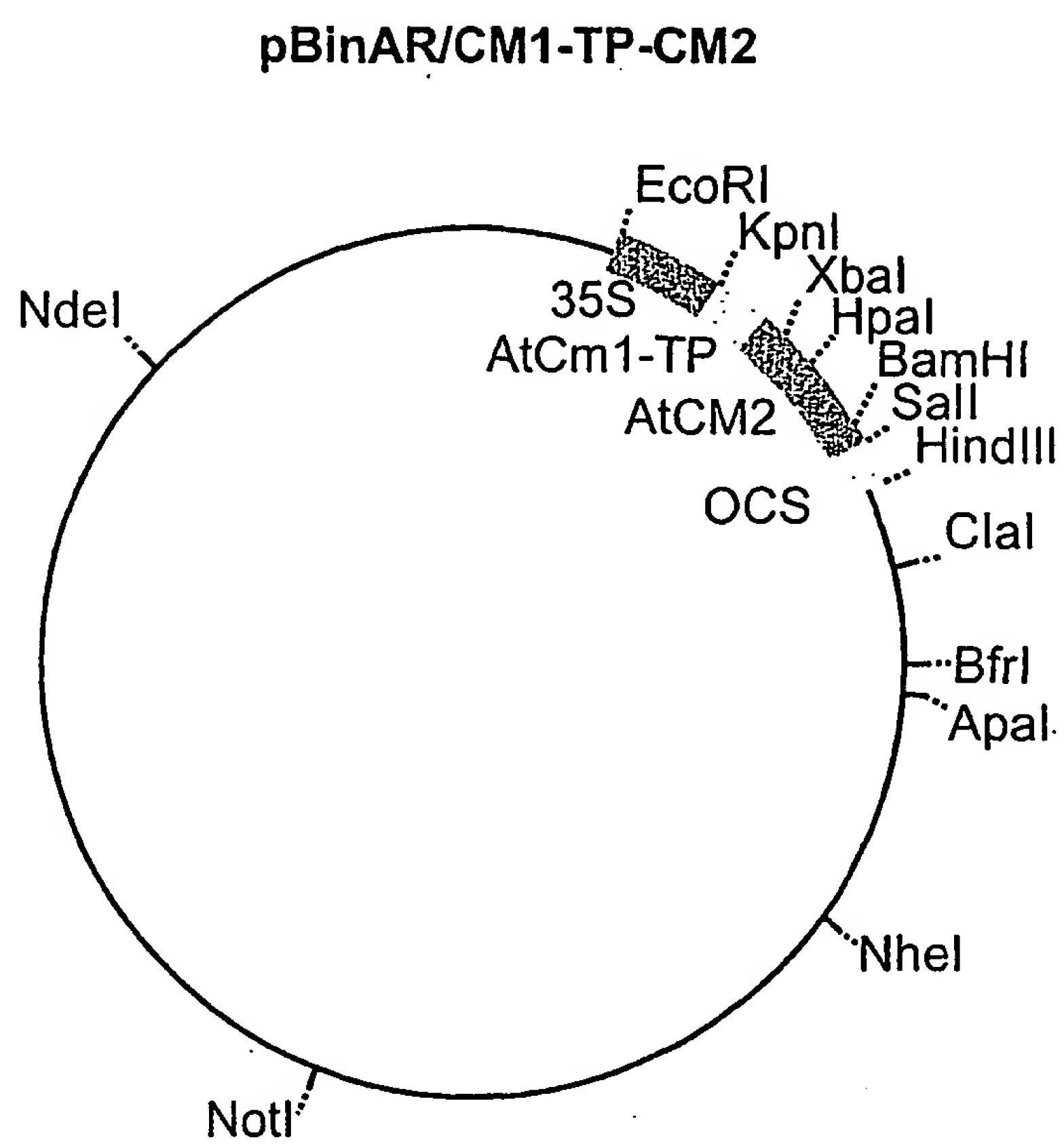
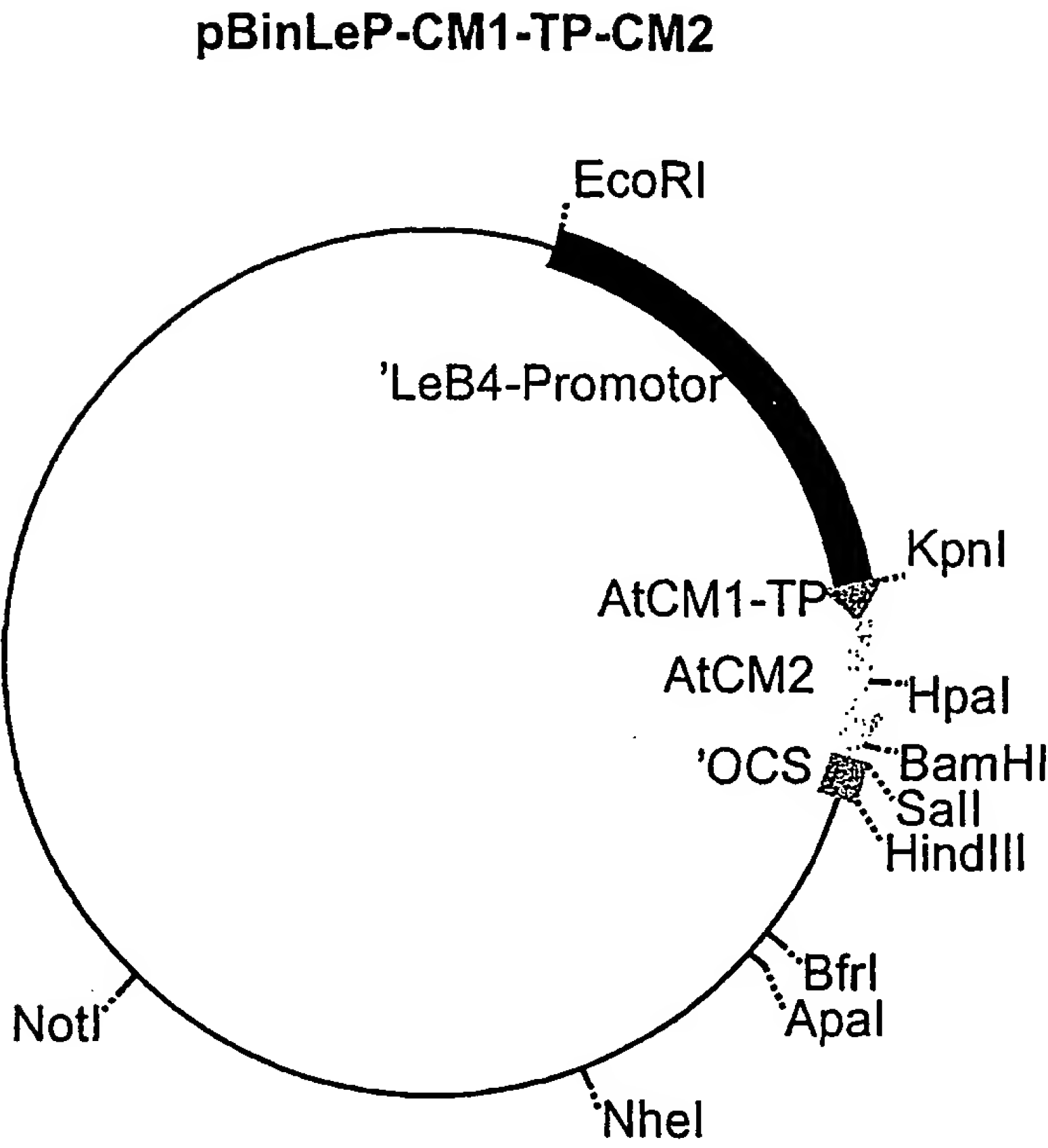


FIG.6

6/6



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co. KGaA

<120> Veränderung des Gehalts an Feinchemikalien in  
Organismen durch genetische Veränderung des  
Shikimatweges

&lt;130&gt; 0817/780/2000

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1238

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (25)..(1143)

&lt;400&gt; 1

cccggttggc ttaagaggtt tatt atg gtt gct gaa ttg acc gca tta cgc 51  
Met Val Ala Glu Leu Thr Ala Leu Arg  
1 5

gat caa att gat gaa gtc gat aaa gcg ctg ctg aat tta tta gcg aag 99  
Asp Gln Ile Asp Glu Val Asp Lys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Ala Lys  
10 15 20 25

cgt ctg gaa ctg gtt gct gaa gtg ggc gag gtg aaa agc cgc ttt gga 147  
Arg Leu Glu Leu Val Ala Glu Val Gly Glu Val Lys Ser Arg Phe Gly  
30 35 40

ctg cct att tat gtt ccg gag cgc gag gca tct atg ttg gcc tcg cgt 195  
Leu Pro Ile Tyr Val Pro Glu Arg Glu Ala Ser Met Leu Ala Ser Arg  
45 50 55

cgt gca gag gcg gaa gct ctg ggt gta ccg cca gat ctg att gag gat 243  
Arg Ala Glu Ala Glu Ala Leu Gly Val Pro Pro Asp Leu Ile Glu Asp  
60 65 70

gtt ttg cgt cgg gtg atg cgt gaa tct tac tcc agt gaa aac gac aaa 291  
Val Leu Arg Arg Val Met Arg Glu Ser Tyr Ser Ser Glu Asn Asp Lys  
75 80 85



## 2

gga ttt aaa aca ctt tgt ccg tca ctg cgt ccg gtg gtt atc gtc ggc 339  
 Gly Phe Lys Thr Leu Cys Pro Ser Leu Arg Pro Val Val Ile Val Gly  
 90 95 100 105

ggt ggc ggt cag atg gga cgc ctg ttc gag aag atg ctg acc ctc tcg 387  
 Gly Gly Gly Gln Met Gly Arg Leu Phe Glu Lys Met Leu Thr Leu Ser  
 110 115 120

ggt tat cag gtg cgg att ctg gag caa cat gac tgg gat cga gcg gct 435  
 Gly Tyr Gln Val Arg Ile Leu Glu Gln His Asp Trp Asp Arg Ala Ala  
 125 130 135

gat att gtt gcc gat gcc gga atg gtg att gtt agt gtg cca atc cac 483  
 Asp Ile Val Ala Asp Ala Gly Met Val Ile Val Ser Val Pro Ile His  
 140 145 150

gtt act gag caa gtt att ggc aaa tta ccg cct tta ccg aaa gat tgt 531  
 Val Thr Glu Gln Val Ile Gly Lys Leu Pro Pro Leu Pro Lys Asp Cys  
 155 160 165

att ctg gtc gat ctg gca tca gtg aaa aat ggg cca tta cag gcc atg 579  
 Ile Leu Val Asp Leu Ala Ser Val Lys Asn Gly Pro Leu Gln Ala Met  
 170 175 180 185

ctg gtg gcg cat gat ggt ccg gtg ctg ggg cta cac ccg atg ttc ggt 627  
 Leu Val Ala His Asp Gly Pro Val Leu Gly Leu His Pro Met Phe Gly  
 190 195 200

ccg gac agc ggt agc ctg gca aag caa gtt gtg gtc tgg tgt gat gga 675  
 Pro Asp Ser Gly Ser Leu Ala Lys Gln Val Val Val Trp Cys Asp Gly  
 205 210 215

cgt aaa ccg gaa gca tac caa tgg ttt ctg gag caa att cag gtc tgg 723  
 Arg Lys Pro Glu Ala Tyr Gln Trp Phe Leu Glu Gln Ile Gln Val Trp  
 220 225 230

ggc gct cgg ctg cat cgt att agc gcc gtc gag cac gat cag aat atg 771  
 Gly Ala Arg Leu His Arg Ile Ser Ala Val Glu His Asp Gln Asn Met  
 235 240 245

gcg ttt att cag gca ctg cgc cac ttt gct act ttt gct tac ggg ctg 819  
 Ala Phe Ile Gln Ala Leu Arg His Phe Ala Thr Phe Ala Tyr Gly Leu  
 250 255 260 265

cac ctg gca gaa gaa aat gtt cag ctt gag caa ctt ctg gcg ctc tct 867  
 His Leu Ala Glu Glu Asn Val Gln Leu Glu Gln Leu Leu Ala Leu Ser  
 270 275 280

tcg ccg att tac cgc ctt gag ctg gcg atg gtc ggg cga ctg ttt gct 915  
 Ser Pro Ile Tyr Arg Leu Glu Leu Ala Met Val Gly Arg Leu Phe Ala  
 285 290 295

## 3

cag gat ccg cag ctt tat gcc gac atc att atg tcg tca gag cgt aat 963  
 Gln Asp Pro Gln Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Met Ser Ser Glu Arg Asn  
           300                    305                    310

ctg gcg tta atc aaa cgt tac tat aag cgt ttc ggc gag gcg att gag 1011  
 Leu Ala Leu Ile Lys Arg Tyr Tyr Lys Arg Phe Gly Glu Ala Ile Glu  
           315                    320                    325

ttg ctg gag cag ggc gat aag cag gcg ttt att gac agt ttc cgc aag 1059  
 Leu Leu Glu Gln Gly Asp Lys Gln Ala Phe Ile Asp Ser Phe Arg Lys  
 330                    335                    340                    345

gtg gag cac tgg ttc ggc gat tac gca cag cgt ttt cag agt gaa agc 1107  
 Val Glu His Trp Phe Gly Asp Tyr Ala Gln Arg Phe Gln Ser Glu Ser  
                     350                    355                    360

cgc gtg tta ttg cgt cag gcg aat gac aat cgc cag taataatcca 1153  
 Arg Val Leu Leu Arg Gln Ala Asn Asp Asn Arg Gln  
                     365                    370

gtgccggatg attcacatca tccggcacct tttcatcagg ttggatcaac aggcactacg 1213

ttctcacttg ggtaacagcg tcgac 1238

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 373

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 2

Met Val Ala Glu Leu Thr Ala Leu Arg Asp Gln Ile Asp Glu Val Asp  
   1                    5                    10                    15

Lys Ala Leu Leu Asn Leu Leu Ala Lys Arg Leu Glu Leu Val Ala Glu  
           20                    25                    30

Val Gly Glu Val Lys Ser Arg Phe Gly Leu Pro Ile Tyr Val Pro Glu  
           35                    40                    45

Arg Glu Ala Ser Met Leu Ala Ser Arg Arg Ala Glu Ala Glu Ala Leu  
           50                    55                    60

Gly Val Pro Pro Asp Leu Ile Glu Asp Val Leu Arg Arg Val Met Arg  
   65                    70                    75                    80

Glu Ser Tyr Ser Ser Glu Asn Asp Lys Gly Phe Lys Thr Leu Cys Pro  
           85                    90                    95

4

Ser	Leu	Arg	Pro	Val	Val	Ile	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Met	Gly	Arg	100	105	110	
Leu	Phe	Glu	Lys	Met	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gln	Val	Arg	Ile	Leu	115	120	125	
Glu	Gln	His	Asp	Trp	Asp	Arg	Ala	Ala	Asp	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Gly	130	135	140	
Met	Val	Ile	Val	Ser	Val	Pro	Ile	His	Val	Thr	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	145	150	155	160
Lys	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Asp	Cys	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Ala	Ser	165	170	175	
Val	Lys	Asn	Gly	Pro	Leu	Gln	Ala	Met	Leu	Val	Ala	His	Asp	Gly	Pro	180	185	190	
Val	Leu	Gly	Leu	His	Pro	Met	Phe	Gly	Pro	Asp	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	195	200	205	
Lys	Gln	Val	Val	Val	Trp	Cys	Asp	Gly	Arg	Lys	Pro	Glu	Ala	Tyr	Gln	210	215	220	
Trp	Phe	Leu	Glu	Gln	Ile	Gln	Val	Trp	Gly	Ala	Arg	Leu	His	Arg	Ile	225	230	235	240
Ser	Ala	Val	Glu	His	Asp	Gln	Asn	Met	Ala	Phe	Ile	Gln	Ala	Leu	Arg	245	250	255	
His	Phe	Ala	Thr	Phe	Ala	Tyr	Gly	Leu	His	Leu	Ala	Glu	Glu	Asn	Val	260	265	270	
Gln	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Pro	Ile	Tyr	Arg	Leu	Glu	275	280	285	
Leu	Ala	Met	Val	Gly	Arg	Leu	Phe	Ala	Gln	Asp	Pro	Gln	Leu	Tyr	Ala	290	295	300	
Asp	Ile	Ile	Met	Ser	Ser	Glu	Arg	Asn	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	Tyr	305	310	315	320
Tyr	Lys	Arg	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Gly	Asp	Lys	325	330	335	
Gln	Ala	Phe	Ile	Asp	Ser	Phe	Arg	Lys	Val	Glu	His	Trp	Phe	Gly	Asp	340	345	350	
Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe	Gln	Ser	Glu	Ser	Arg	Val	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	355	360	365	

Asn Asp Asn Arg Gln  
370

<210> 3

<211> 1006

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (64)..(858)

<400> 3

ctttagcatt gaggaagaag aagaagaaag cttcattttt ccaggggata cagttgaagc 60

ggc	atg	gca	aga	gtc	ttc	gaa	tcg	gat	tcg	ggt	tct	ggt	tgt	tcc	aat	108
Met	Ala	Arg	Val	Phe	Glu	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Cys	Ser	Asn		
1				5					10					15		

gta	ctg	agt	ctt	gac	tta	atc	aga	gaa	tcg	ttg	att	agg	caa	gaa	gac	156
Val	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ser	Leu	Ile	Arg	Gln	Glu	Asp	
				20					25					30		

acc	atc	gtc	ttc	agc	ttg	atc	gag	aga	gct	aag	ttt	cca	ctc	aat	tct	204
Thr	Ile	Val	Phe	Ser	Leu	Ile	Glu	Arg	Ala	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	
			35					40					45			

cct	gct	ttc	gag	gaa	tct	cgt	tgt	cta	gat	tct	gga	agt	ttc	tct	tct	252
Pro	Ala	Phe	Glu	Glu	Ser	Arg	Cys	Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Phe	Ser	Ser	
		50					55					60				

ctc	act	gag	ttt	ttc	gtc	aga	gag	aca	gaa	atc	atc	caa	gct	aag	gta	300
Leu	Thr	Glu	Phe	Phe	Val	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Ile	Gln	Ala	Lys	Val	
	65					70				75						

gga	aga	tat	gaa	tac	ccg	gaa	gag	aat	cct	ttc	ttc	ctt	gag	aac	att	348
Gly	Arg	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Leu	Glu	Asn	Ile	
80					85				90					95		

cct	cac	tcg	gtt	ttt	cct	acg	cac	aaa	tat	cca	tcg	gct	ttg	cac	cct	396
Pro	His	Ser	Val	Phe	Pro	Thr	His	Lys	Tyr	Pro	Ser	Ala	Leu	His	Pro	
			100					105					110			

aag	gct	cta	tct	gtt	aac	att	aac	aaa	caa	atc	tgg	gat	att	tac	ttt	444
Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Asn	Ile	Asn	Lys	Gln	Ile	Trp	Asp	Ile	Tyr	Phe	
		115					120					125				

aaa	gaa	ttg	ctt	cct	ttg	ttt	gtc	aaa	cct	ggc	gat	gat	ggc	aac	tat	492
Lys	Glu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	
	130						135					140				

```

cca tca act gct gct agt gat ctc gcc tgt tta caa gct ctt tcg aga 540
Pro Ser Thr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Cys Leu Gln Ala Leu Ser Arg
      145                150                155

agg att cac tac ggt aaa ttt gta gct gag gtc aaa ttc aga gat gct 588
Arg Ile His Tyr Gly Lys Phe Val Ala Glu Val Lys Phe Arg Asp Ala
160                165                170                175

cca caa gat tac gag cct gcg att cgc gct cag gat aga gag gct ttg 636
Pro Gln Asp Tyr Glu Pro Ala Ile Arg Ala Gln Asp Arg Glu Ala Leu
      180                185                190

atg aag ctg ttg acg ttt gag aaa gta gaa gaa atg gtt aag aag aga 684
Met Lys Leu Leu Thr Phe Glu Lys Val Glu Glu Met Val Lys Lys Arg
      195                200                205

gtg cag aag aaa gca gaa acg ttt gga caa gaa gta aaa ttc aac tct 732
Val Gln Lys Lys Ala Glu Thr Phe Gly Gln Glu Val Lys Phe Asn Ser
      210                215                220

ggc tat ggc gat gag agt aag aag aag tat aaa gtg gat cca ttg ctt 780
Gly Tyr Gly Asp Glu Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Val Asp Pro Leu Leu
      225                230                235

gcc tct cgc atc tac ggg gaa tgg ctt atc cct ctc act aag ctc gtt 828
Ala Ser Arg Ile Tyr Gly Glu Trp Leu Ile Pro Leu Thr Lys Leu Val
240                245                250                255

gag gtt gag tat ctt cta cgt cgt ctc gat tgaatattat ttgtatccaa 878
Glu Val Glu Tyr Leu Leu Arg Arg Leu Asp
      260                265

atctggccct gttaaagtgg gccttaagtt tttaagtggg cctggttgata tttgtcagga 938

tatgatagaa taattgaatg aagcaacaca gtcatcacta ttttaaattt tgtaagatat 998

tttaagga 1006

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 265

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 4

```

Met Ala Arg Val Phe Glu Ser Asp Ser Gly Ser Gly Cys Ser Asn Val
  1                5                10                15

```

```

Leu Ser Leu Asp Leu Ile Arg Glu Ser Leu Ile Arg Gln Glu Asp Thr
      20                25                30

```

Ile	Val	Phe	Ser	Leu	Ile	Glu	Arg	Ala	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Pro			
		35					40					45						
Ala	Phe	Glu	Glu	Ser	Arg	Cys	Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Phe	Ser	Ser	Leu			
		50				55					60							
Thr	Glu	Phe	Phe	Val	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Ile	Gln	Ala	Lys	Val	Gly			
					70					75					80			
Arg	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Leu	Glu	Asn	Ile	Pro			
				85					90					95				
His	Ser	Val	Phe	Pro	Thr	His	Lys	Tyr	Pro	Ser	Ala	Leu	His	Pro	Lys			
			100					105					110					
Ala	Leu	Ser	Val	Asn	Ile	Asn	Lys	Gln	Ile	Trp	Asp	Ile	Tyr	Phe	Lys			
		115					120					125						
Glu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Pro			
		130				135					140							
Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Leu	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Arg			
		145			150					155					160			
Ile	His	Tyr	Gly	Lys	Phe	Val	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Arg	Asp	Ala	Pro			
				165					170					175				
Gln	Asp	Tyr	Glu	Pro	Ala	Ile	Arg	Ala	Gln	Asp	Arg	Glu	Ala	Leu	Met			
			180					185					190					
Lys	Leu	Leu	Thr	Phe	Glu	Lys	Val	Glu	Glu	Met	Val	Lys	Lys	Arg	Val			
		195					200					205						
Gln	Lys	Lys	Ala	Glu	Thr	Phe	Gly	Gln	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Ser	Gly			
		210				215					220							
Tyr	Gly	Asp	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Val	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala			
		225			230					235					240			
Ser	Arg	Ile	Tyr	Gly	Glu	Trp	Leu	Ile	Pro	Leu	Thr	Lys	Leu	Val	Glu			
				245					250					255				
Val	Glu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Asp										
			260					265										



&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 993

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Die Beschreibung von Kntstliche Sequenz: Chimäre  
 Nukleins.: Transitpept. der plastid.  
 Chorismatm.+kod. Sequenz der cytosolischen  
 Chorismatmutase

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(993)

&lt;400&gt; 5

atg aga tcg tct tgt tgc tcc tct gcg att ggt ggg ttc ttc gac cat	48
Met Arg Ser Ser Cys Cys Ser Ser Ala Ile Gly Gly Phe Phe Asp His	
1 5 10 15	
 cga cgt gaa tta tca acc tca aca ccc att tcc act ctt ctt cct ctt	96
Arg Arg Glu Leu Ser Thr Ser Thr Pro Ile Ser Thr Leu Leu Pro Leu	
20 25 30	
 cca tca acc aaa tct tct ttc tct gtt cgt tgt tct ctt cct cag cca	144
Pro Ser Thr Lys Ser Ser Phe Ser Val Arg Cys Ser Leu Pro Gln Pro	
35 40 45	
 tca aag cca cgc tct gga acc agc tct gtt cac gcc gtt atg aca ctc	192
Ser Lys Pro Arg Ser Gly Thr Ser Ser Val His Ala Val Met Thr Leu	
50 55 60	
 gcc atg gca aga gtc ttc gaa tcg gat tcg ggt tct ggt tgt tcc aat	240
Ala Met Ala Arg Val Phe Glu Ser Asp Ser Gly Ser Gly Cys Ser Asn	
65 70 75 80	
 gta ctg agt ctt gac tta atc aga gaa tcg ttg att agg caa gaa gac	288
Val Leu Ser Leu Asp Leu Ile Arg Glu Ser Leu Ile Arg Gln Glu Asp	
85 90 95	
 acc atc gtc ttc agc ttg atc gag aga gct aag ttt cca ctc aat tct	336
Thr Ile Val Phe Ser Leu Ile Glu Arg Ala Lys Phe Pro Leu Asn Ser	
100 105 110	
 cct gct ttc gag gaa tct cgt tgt cta gat tct gga agt ttc tct tct	384
Pro Ala Phe Glu Glu Ser Arg Cys Leu Asp Ser Gly Ser Phe Ser Ser	
115 120 125	
 ctc act gag ttt ttc gtc aga gag aca gaa atc atc caa gct aag gta	432
Leu Thr Glu Phe Phe Val Arg Glu Thr Glu Ile Ile Gln Ala Lys Val	
130 135 140	

gga aga tat gaa tac ccg gaa gag aat cct ttc ttc ctt gag aac att	480
Gly Arg Tyr Glu Tyr Pro Glu Glu Asn Pro Phe Phe Leu Glu Asn Ile	
145 150 155 160	
cct cac tcg gtt ttt cct acg cac aaa tat cca tcg gct ttg cac cct	528
Pro His Ser Val Phe Pro Thr His Lys Tyr Pro Ser Ala Leu His Pro	
165 170 175	
aag gct cta tct gtt aac att aac aaa caa atc tgg gat att tac ttt	576
Lys Ala Leu Ser Val Asn Ile Asn Lys Gln Ile Trp Asp Ile Tyr Phe	
180 185 190	
aaa gaa ttg ctt cct ttg ttt gtc aaa cct ggc gat gat ggc aac tat	624
Lys Glu Leu Leu Pro Leu Phe Val Lys Pro Gly Asp Asp Gly Asn Tyr	
195 200 205	
cca tca act gct gct agt gat ctc gcc tgt tta caa gct ctt tcg aga	672
Pro Ser Thr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Cys Leu Gln Ala Leu Ser Arg	
210 215 220	
agg att cac tac ggt aaa ttt gta gct gag gtc aaa ttc aga gat gct	720
Arg Ile His Tyr Gly Lys Phe Val Ala Glu Val Lys Phe Arg Asp Ala	
225 230 235 240	
cca caa gat tac gag cct gcg att cgc gct cag gat aga gag gct ttg	768
Pro Gln Asp Tyr Glu Pro Ala Ile Arg Ala Gln Asp Arg Glu Ala Leu	
245 250 255	
atg aag ctg ttg acg ttt gag aaa gta gaa gaa atg gtt aag aag aga	816
Met Lys Leu Leu Thr Phe Glu Lys Val Glu Glu Met Val Lys Lys Arg	
260 265 270	
gtg cag aag aaa gca gaa acg ttt gga caa gaa gta aaa ttc aac tct	864
Val Gln Lys Lys Ala Glu Thr Phe Gly Gln Glu Val Lys Phe Asn Ser	
275 280 285	
ggc tat ggc gat gag agt aag aag aag tat aaa gtg gat cca ttg ctt	912
Gly Tyr Gly Asp Glu Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Val Asp Pro Leu Leu	
290 295 300	
gcc tct cgc atc tac ggg gaa tgg ctt atc cct ctc act aag ctc gtt	960
Ala Ser Arg Ile Tyr Gly Glu Trp Leu Ile Pro Leu Thr Lys Leu Val	
305 310 315 320	
gag gtt gag tat ctt cta cgt cgt ctc gat tga	993
Glu Val Glu Tyr Leu Leu Arg Arg Leu Asp	
325 330	

10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 6

Met	Arg	Ser	Ser	Cys	Cys	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Gly	Phe	Phe	Asp	His
1				5					10					15	
Arg	Arg	Glu	Leu	Ser	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu
			20					25					30		
Pro	Ser	Thr	Lys	Ser	Ser	Phe	Ser	Val	Arg	Cys	Ser	Leu	Pro	Gln	Pro
			35				40					45			
Ser	Lys	Pro	Arg	Ser	Gly	Thr	Ser	Ser	Val	His	Ala	Val	Met	Thr	Leu
	50					55					60				
Ala	Met	Ala	Arg	Val	Phe	Glu	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Cys	Ser	Asn
65					70					75					80
Val	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ser	Leu	Ile	Arg	Gln	Glu	Asp
				85					90					95	
Thr	Ile	Val	Phe	Ser	Leu	Ile	Glu	Arg	Ala	Lys	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser
			100					105					110		
Pro	Ala	Phe	Glu	Glu	Ser	Arg	Cys	Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Phe	Ser	Ser
		115					120					125			
Leu	Thr	Glu	Phe	Phe	Val	Arg	Glu	Thr	Glu	Ile	Ile	Gln	Ala	Lys	Val
	130					135					140				
Gly	Arg	Tyr	Glu	Tyr	Pro	Glu	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	Leu	Glu	Asn	Ile
145					150					155					160
Pro	His	Ser	Val	Phe	Pro	Thr	His	Lys	Tyr	Pro	Ser	Ala	Leu	His	Pro
				165					170					175	
Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Asn	Ile	Asn	Lys	Gln	Ile	Trp	Asp	Ile	Tyr	Phe
			180					185					190		
Lys	Glu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr
		195					200					205			
Pro	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Leu	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg
		210				215					220				
Arg	Ile	His	Tyr	Gly	Lys	Phe	Val	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Arg	Asp	Ala
225					230					235					240

## 11

Pro Gln Asp Tyr Glu Pro Ala Ile Arg Ala Gln Asp Arg Glu Ala Leu  
 245 250 255

Met Lys Leu Leu Thr Phe Glu Lys Val Glu Glu Met Val Lys Lys Arg  
 260 265 270

Val Gln Lys Lys Ala Glu Thr Phe Gly Gln Glu Val Lys Phe Asn Ser  
 275 280 285

Gly Tyr Gly Asp Glu Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Val Asp Pro Leu Leu  
 290 295 300

Ala Ser Arg Ile Tyr Gly Glu Trp Leu Ile Pro Leu Thr Lys Leu Val  
 305 310 315 320

Glu Val Glu Tyr Leu Leu Arg Arg Leu Asp  
 325 330

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (20)..(217)

&lt;400&gt; 7

ggtaccggcg tcattgttg atg aga tcg tct tgt tgc tcc tct gcg att ggt 52  
 Met Arg Ser Ser Cys Cys Ser Ser Ala Ile Gly  
 1 5 10

ggg ttc ttc gac cat cga cgt gaa tta tca acc tca aca ccc att tcc 100  
 Gly Phe Phe Asp His Arg Arg Glu Leu Ser Thr Ser Thr Pro Ile Ser  
 15 20 25

act ctt ctt cct ctt cca tca acc aaa tct tct ttc tct gtt cgt tgt 148  
 Thr Leu Leu Pro Leu Pro Ser Thr Lys Ser Ser Phe Ser Val Arg Cys  
 30 35 40

tct ctt cct cag cca tca aag cca cgc tct gga acc agc tct gtt cac 196  
 Ser Leu Pro Gln Pro Ser Lys Pro Arg Ser Gly Thr Ser Ser Val His  
 45 50 55

gcc gtt atg aca ctc gcc atg g 218  
 Ala Val Met Thr Leu Ala Met  
 60 65

## 12

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 66

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 8

Met Arg Ser Ser Cys Cys Ser Ser Ala Ile Gly Gly Phe Phe Asp His  
1 5 10 15

Arg Arg Glu Leu Ser Thr Ser Thr Pro Ile Ser Thr Leu Leu Pro Leu  
20 25 30

Pro Ser Thr Lys Ser Ser Phe Ser Val Arg Cys Ser Leu Pro Gln Pro  
35 40 45

Ser Lys Pro Arg Ser Gly Thr Ser Ser Val His Ala Val Met Thr Leu  
50 55 60

Ala Met

65

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Kntliche Sequenz:Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;400&gt; 9

aagtcgacgc tgttacccaa gtgagaacg

29

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Kntliche Sequenz:Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(30)

13

&lt;400&gt; 10

aaccgcgggtg gcttaagagg tttattatgg

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;400&gt; 11

ggtaccggcg tcattgttga tgagatcg

28

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(24)

&lt;400&gt; 12

ccatgggtggc gagtgtcata acgg

24

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(27)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 13

gtcgactcaa tcgagacgac gtagaag

27



14

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; primer\_bind

&lt;222&gt; (1)..(25)

&lt;400&gt; 14

ccatgggcaa gagtcttcga atcgg

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter      nal Application No  
PCT/EP 01/07391

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7    C12N15/82    C12N15/62    C12N9/02    C12N9/90    A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7    C12N    A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CAB Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 264 914 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 27 April 1988 (1988-04-27) the whole document	1-6, 28, 29, 33-37 15-17
A	---	
X	WO 91 04263 A (NUTRASWEET CO) 4 April 1991 (1991-04-04) the whole document	1-6, 28, 29, 33-37
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 October 2001

Date of mailing of the international search report

05/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/07391

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EBERHARD J ET AL: "Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from Arabidopsis thaliana: Molecular characterization and enzymatic properties." PLANT JOURNAL, vol. 10, no. 5, 1996, pages 815-821, XP002180796 ISSN: 0960-7412 cited in the application	1-6, 28, 29, 33-37
A	the whole document	9-14
A	----- HUDSON G S ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND TRANSCRIPTION OF THE PHENYLALANINE AND TYROSINE OPERONS OF ESCHERICHIA-COLI K-12" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 180, no. 4, 1984, pages 1023-1052, XP001030690 ISSN: 0022-2836 page 1048 -page 1050; figure 3	18-20, 24
A	----- WO 00 08169 A (EBNETH MARCUS ;HERBERS KARIN (DE); REINDL ANDREAS (DE); SUNGENE GM) 17 February 2000 (2000-02-17) cited in the application the whole document -----	1-37

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/07391

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0264914	A	27-04-1988	JP	63105688 A	10-05-1988
			EP	0264914 A2	27-04-1988
			KR	9004427 B1	25-06-1990
WO 9104263	A	04-04-1991	US	5120837 A	09-06-1992
			AT	119199 T	15-03-1995
			AU	647417 B2	24-03-1994
			AU	6517990 A	18-04-1991
			CA	2025491 A1	21-03-1991
			DE	69017331 D1	06-04-1995
			DE	69017331 T2	21-09-1995
			DK	418840 T3	27-03-1995
			EP	0418840 A2	27-03-1991
			ES	2068300 T3	16-04-1995
			GR	3015250 T3	30-06-1995
			HU	215148 B	28-12-1998
			IE	903378 A1	10-04-1991
			JP	7071499 B	02-08-1995
			JP	4501813 T	02-04-1992
			KR	146371 B1	15-07-1998
			RU	2070575 C1	20-12-1996
			WO	9104263 A1	04-04-1991
WO 0008169	A	17-02-2000	DE	19835219 A1	10-02-2000
			DE	19845216 A1	06-04-2000
			DE	19845231 A1	06-04-2000
			DE	19845224 A1	06-04-2000
			AU	5415799 A	28-02-2000
			WO	0008169 A1	17-02-2000
			EP	1102852 A1	30-05-2001

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07391

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N15/62 C12N9/02 C12N9/90 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CAB Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A  X	EP 0 264 914 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 27. April 1988 (1988-04-27) das ganze Dokument --- WO 91 04263 A (NUTRASWEET CO) 4. April 1991 (1991-04-04) das ganze Dokument --- -/--	1-6, 28, 29, 33-37 15-17  1-6, 28, 29, 33-37

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07391

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EBERHARD J ET AL: "Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from Arabidopsis thaliana: Molecular characterization and enzymatic properties." PLANT JOURNAL, Bd. 10, Nr. 5, 1996, Seiten 815-821, XP002180796 ISSN: 0960-7412 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-6,28, 29,33-37
A	----	9-14
A	HUDSON G S ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND TRANSCRIPTION OF THE PHENYLALANINE AND TYROSINE OPERONS OF ESCHERICHIA-COLI K-12" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 180, Nr. 4, 1984, Seiten 1023-1052, XP001030690 ISSN: 0022-2836 Seite 1048 -Seite 1050; Abbildung 3 -----	18-20,24
A	WO 00 08169 A (EBNETH MARCUS ;HERBERS KARIN (DE); REINDL ANDREAS (DE); SUNGENE GM) 17. Februar 2000 (2000-02-17) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-37



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07391

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0264914 A	27-04-1988	JP 63105688 A	10-05-1988
		EP 0264914 A2	27-04-1988
		KR 9004427 B1	25-06-1990
WO 9104263 A	04-04-1991	US 5120837 A	09-06-1992
		AT 119199 T	15-03-1995
		AU 647417 B2	24-03-1994
		AU 6517990 A	18-04-1991
		CA 2025491 A1	21-03-1991
		DE 69017331 D1	06-04-1995
		DE 69017331 T2	21-09-1995
		DK 418840 T3	27-03-1995
		EP 0418840 A2	27-03-1991
		ES 2068300 T3	16-04-1995
		GR 3015250 T3	30-06-1995
		HU 215148 B	28-12-1998
		IE 903378 A1	10-04-1991
		JP 7071499 B	02-08-1995
		JP 4501813 T	02-04-1992
		KR 146371 B1	15-07-1998
		RU 2070575 C1	20-12-1996
		WO 9104263 A1	04-04-1991
WO 0008169 A	17-02-2000	DE 19835219 A1	10-02-2000
		DE 19845216 A1	06-04-2000
		DE 19845231 A1	06-04-2000
		DE 19845224 A1	06-04-2000
		AU 5415799 A	28-02-2000
		WO 0008169 A1	17-02-2000
		EP 1102852 A1	30-05-2001